

MARIA TERESA GRANELLA LANG

**BUTIRILCOLINESTERASE, OUTRAS VARIÁVEIS BIOQUÍMICO-HORMONAIS  
E ÍNDICE DE MASSA CORPORAL EM MULHERES CLIMATÉRICAS,  
ANTES E APÓS TERAPIA DE REPOSIÇÃO HORMONAL**

Dissertação apresentada como requisito para  
obtenção do grau de Mestre em Ciências  
Farmacêuticas do programa de Pós-Graduação  
da Universidade Federal do Paraná - UFPR.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Vânia Manfredini  
Alcântara

Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Mariléia Scartezini

CURITIBA  
2004

## TERMO DE APROVAÇÃO

MARIA TERESA GRANELLA LANG

"Butirilcolinesterase, variáveis bioquímico-hormonais e Índice de Massa Corporal em mulheres climatéricas, antes e após Terapia de Reposição Hormonal"

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte Banca Examinadora:



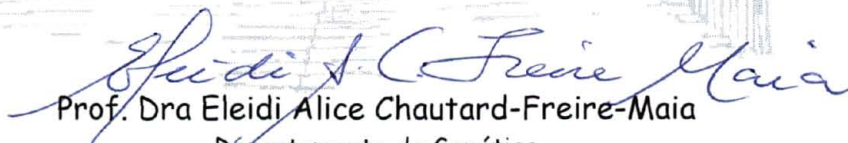
Prof. Vânia Manfredini Alcântara (orientadora)

Departamento de Patologia Médica  
Universidade Federal do Paraná



Prof. Dr. Tânia Leme da Rocha Martinez

Unidade de Dislipidemias - INCOR  
Universidade de São Paulo



Prof. Dra. Eleidi Alice Chautard-Freire-Maia

Departamento de Genética  
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 17 de fevereiro de 2004

**MARIA TERESA GRANELLA LANG**

**BUTIRILCOLINESTERASE, OUTRAS VARIÁVEIS BIOQUÍMICO-HORMONAIS  
E ÍNDICE DE MASSA CORPORAL EM MULHERES CLIMATÉRICAS,  
ANTES E APÓS TERAPIA DE REPOSIÇÃO HORMONAL**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas do programa de Pós-Graduação da Universidade Federal do Paraná - UFPR

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vânia Manfredini Alcântara

Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mariléia Scartezini

**CURITIBA  
2004**

Ao meu marido Cezar e às minhas filhas,  
Maria Gabriela e Marielle, por quem meu amor  
ultrapassa o tempo e a distância...



## **AGRADECIMENTOS**

Meus mais profundos agradecimentos à minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dra. Vânia Manfredini de Alcântara, cuja dedicação, amizade e carinho permitiram que esse trabalho fosse possível e à sua família, especialmente a seu esposo Sr. Benedito Gusmão de Faria, pela compreensão e acolhida.

À minha co-orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dra. Mariléia Scartezini pela orientação e sugestões. À Prof<sup>a</sup>. Dra. Eleidi Alice Chautard-Freire-Maia pela leitura, sugestões e correção do abstract.

Aos professores e coordenadores do curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pelos ensinamentos e empenho.

Ao meu marido Cezar e às minhas filhas Maria Gabriela e Marielle, pela infinita paciência e compreensão nas minhas ausências.

Meus agradecimentos especiais aos Drs (a): Evanildes Guerreiro, Ivete Gnoatto Spagnol, Jussara Locatelli, Mônica Ramos Vieira, Paulo Scottini, Venilton Vieira e as mulheres que participaram dessa pesquisa. Sem a ajuda de todos eles, essa pesquisa não teria sido possível.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Tânia B. Bonfin, Lorena Graef, Marciane Welter, Tatiane Micheli Alves, cuja amizade e ajuda foram fundamentais.

Às amigas do Bio Vitae Laboratório: Dra. Lucinara Cembranel, Dra. Estefania Bernardi, Jucirlei Árcego, Ange Ebeling, Cleide Toscan, Lurdes Godóy, Jucinéia da Silveira, Terezinha da Silveira, Marli Zórzi e Danuza Antunes. Vocês tornaram possíveis as minhas ausências no laboratório e foram amigas especiais.

Ao meu tio Luiz T. P. de Medeiros, pela leitura, sugestões e correção.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação da Universidade Federal do Paraná (FUNPAR), pelos apoios a esse projeto de pesquisa.

Aos meus pais, Terezinha e Nauro Granella, pelo incentivo eterno em aprender sempre mais e pelo maravilhoso ensinamento de vida. Vocês me ensinaram a agradecer sempre a Deus. A Ele, o agradecimento especial por ter abençoado nossas vidas.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>X</b>
<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES .....</b>	<b>XIV</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....</b>	<b>XVI</b>
<b>LISTA DE SÍMBOLOS .....</b>	<b>XIX</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>XXI</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>XXII</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>4</b>
2.1 COLINESTERASES.....	4
2.2 BUTIRILCOLINESTERASE.....	6
2.2.1 Aspectos Gerais .....	6
2.2.2 Estrutura Molecular e Heterogeneidade da BChE .....	7
2.2.3 Locos Determinantes das Variações da BChE.....	10
2.2.3.1 Loco <i>BCHE</i> .....	11
2.2.3.2 Loco <i>CHE2</i> .....	13
2.2.4 Outras Formas Moleculares da BChE .....	14
2.2.5 Alterações na Atividade da BChE .....	16
2.4 FUNÇÕES DA BChE .....	17
2.5 BChE E LÍPIDES .....	18
2.6 BChE E ESTRÓGENOS.....	20
2.7 FASES DA MENOPAUSA .....	21
2.7.1 Definição .....	21
2.7.2 Definições Cronológicas .....	22
2.7.2.1 Fase reprodutiva .....	23
2.7.2.2 Transição da menopausa .....	23
2.7.2.3 Menopausa .....	27
2.7.2.4 Pós-menopausa .....	27
2.7.3 Alterações Hormonais nas Diferentes Fases.....	28
2.7.3.1 Hormônio folículo estimulante (FSH).....	28
2.7.3.2 Estradiol (E <sub>2</sub> ).....	28
2.7.3.3 Hormônio luteinizante (LH) e progesterona .....	29

2.7.3.4 Testosterona .....	29
2.8 TERAPIA DE REPOSIÇÃO HORMONAL (HRT).....	30
2.9 OPÇÕES TERAPÊUTICAS PARA HRT .....	33
2.9.1 Estrógenos .....	33
2.10 FORMULAÇÕES .....	36
2.10.1 Formulações Orais .....	36
2.10.2 Formulações Transdérmicas .....	36
2.10.3 Formulações Tópicas .....	37
2.11 REGIMES TERAPÊUTICOS .....	37
2.11.1 HRT Cíclico .....	37
2.11.2 HRT Ciclo Combinada .....	37
2.11.3 HRT Ciclo Contínua ou Sequencial .....	37
2.11.4 HRT Ciclo Longo Contínua .....	38
2.11.5 HRT Contínua Combinada .....	38
2.11.6 HRT Pulso Contínua ou Intermitente .....	38
2.12 FORMULAÇÕES COMERCIAIS DISPONÍVEIS NO BRASIL.....	38
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>42</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	42
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	42
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>43</b>
4.1 MATERIAL .....	43
4.1.1 Primeira Coleta .....	43
4.1.2 Segunda Coleta.....	44
4.2 MÉTODOS .....	44
4.2.1 Exames Realizados no Bio Vitae Laboratório .....	45
4.2.1.1 Dosagem do hormônio folículo estimulante (FSH).....	45
4.2.1.2 Dosagem do estradiol (E <sub>2</sub> ).....	45
4.2.1.3 Dosagem do hormônio estimulante da tireóide(TSH) .....	45
4.2.1.4 Dosagem da triiodotironina livre (T <sub>3</sub> L) .....	46
4.2.1.5 Dosagem da tiroxina livre (T <sub>4</sub> L) .....	46
4.2.1.6 Determinação do hematócrito (Hc) .....	46
4.2.1.7 Dosagem de hemoglobina (Hb) .....	46
4.2.1.8 Dosagem da fosfatase alcalina (ALP) .....	47

4.2.1.9	Dosagem da gama glutamiltransferase (GGT).....	47
4.2.1.10	Dosagem da aspartato aminotransferase (AST) .....	47
4.2.1.11	Dosagem da alanina aminotransferase (ALT) .....	48
4.2.1.12	Dosagem do colesterol total (CT).....	48
4.2.1.13	Dosagem do colesterol da lipoproteína de alta densidade (HDL-C) .....	48
4.2.1.14	Dosagem do colesterol da lipoproteína de baixa densidade (LDL-C) .....	49
4.2.1.15	Dosagem dos triglicérides (TG) .....	49
4.2.1.16	Dosagem da glicose (GLC).....	49
4.2.1.17	Dosagem da uréia .....	50
4.2.1.18	Dosagem da creatinina (CREA).....	50
4.2.2	Exames Realizados no Laboratório de Bioquímica Clínica da UFPR .....	50
4.2.2.1	Determinação da atividade da BChE (ABChE) .....	50
4.2.2.2	Determinação dos fenótipos do loco <i>CHE2</i> e quantificação da banda C <sub>5</sub> .....	52
4.2.2.3	Quantificação das bandas C <sub>4/5</sub> .....	55
4.2.2.4	Eletroforese em gel de poliacrilamida .....	56
4.2.2.5	Análises estatísticas .....	60
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	62
5.1	ANÁLISES DAS 54 MULHERES DE FENÓTIPO <i>CHE2</i> C <sub>5</sub> –, ANTES DO USO HRT .....	62
5.1.1	Análises Descritivas de algumas Variáveis, antes do Uso de HRT.....	62
5.1.2	Análises de Correlação Simples, entre as Atividades da BChE e algumas Variáveis antes do uso de HRT .....	64
5.1.3	Análises de Regressão Múltipla Escalonada, antes do Uso de HRT .....	67
5.1.4	Análises de Correlação Simples entre as Atividades Absolutas das 13 Bandas da BChE e algumas Variáveis, antes do Uso de HRT.....	68
5.1.5	Análises de Regressão Múltipla Escalonada das Atividades Absolutas das 13 Bandas da BChE e algumas Variáveis antes do Uso de HRT.....	71
5.1.6	Análise de uma Mulher Climatérica que Apresentou Banda Extra na Eletroforese em Gel de Ágar Ácido.....	73

5.1.7 Comparação das Médias de algumas Variáveis Obtidas antes da HRT de uma Mulher Climatérica, de Fenótipo CHE2 C5– que Apresentou Banda Extra com aquelas de 53 Mulheres Climatéricas, de Fenótipo CHE2 C5–, que não Apresentaram esta Banda.....	73
5.2 ANÁLISES DAS MULHERES CLIMATÉRICAS DE FENÓTIPO CHE2 C5–, APÓS USO DE HRT.....	74
5.2.1 Comparação das Médias das Variáveis da BChE Analisadas no Presente Estudo, após o uso de HRT com aquelas Obtidas antes de seu Uso.....	76
5.2.2 Comparação das Médias de Variáveis Obtidas antes e após do Uso de HRT.....	77
5.2.3 Comparação das Médias de CT, TG, LDL-C, HDL-C E <sub>2</sub> Obtidos antes e após o uso de Tibolona .....	80
5.2.4 Comparação das Médias das Atividades Absolutas das 13 Bandas da BChE Obtidas, antes e após o Uso de HRT.....	80
5.2.5 Resultados das Análises de Correlação Simples, entre as Atividades da BChE e algumas Variáveis, após o uso de HRT.....	83
5.2.6 Resultados das Análises de Regressão Múltipla Escalonada, Obtidos de Amostras de Mulheres Climatéricas, após Uso de HRT, sem Tibolona .....	84
5.2.7 Resultados das Análises de Correlação Simples das 13 Bandas da BChE e algumas Variáveis, Obtidas em Amostras de 29 Mulheres Climatéricas após o Uso de HRT sem uso de Tibolona .....	85
5.2.8 Resultados das Análises de Regressão Múltipla Escalonada Obtidos de Amostras de 29 Mulheres Climatéricas após o Uso de HRT sem uso de Tibolona .....	87
5.3 ANÁLISES DAS 6 MULHERES CLIMATÉRICAS DE FENÓTIPO CHE2 C5+, ANTES E APÓS O USO DE HRT.....	88
5.3.1 Comparação das Médias das Variáveis Analisadas entre os Fenótipos CHE2 C5– e CHE2 C5+ .....	89
5.3.2 Valores da ABChE e ARC <sub>5</sub> nas Mulheres Climatéricas antes e após HRT .....	89

5.3.3 Análises de Correlação Simples das Mulheres Climatéricas de Fenótipo CHE2 C5+ antes e após o Uso de HRT .....	89
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>93</b>
6.1 ANÁLISE DAS 54 MULHERES CLIMATÉRICAS DE FENÓTIPO CHE2 C5–, ANTES DO USO DE HRT.....	93
6.1.1 Análises Descritivas de algumas Variáveis Analisadas no Presente Trabalho antes da HRT.....	93
6.1.2 Análises de Correlação Simples entre as Atividades da BChE e algumas Variáveis Analisadas antes do Uso de HRT.....	96
6.1.3 Análises de Regressão Múltipla Escalonada, antes do Uso de HRT.....	98
6.1.4 Análises de Correlação Simples entre as Atividades Absolutas das 13 Bandas da BChE e algumas Variáveis, antes do Uso de HRT.....	99
6.1.5 Análises de Regressão Múltipla Escalonada entre as Atividades Absolutas das 13 Bandas da BChE e algumas Variáveis , antes da HRT..	99
6.1.6 Análise de uma Mulher Climatérica que Apresentou Banda Extra na Eletroforese em Gel de Ágar Ácido .....	101
6.1.7 Comparação das Médias de algumas Variáveis Obtidas antes da HRT de uma Mulher Climatérica, de Fenótipo CHE2 C5– que Apresentou Banda Extra com aquelas de 53 Mulheres Climatéricas, de Fenótipo CHE2 C5–, que não Apresentaram esta Banda .....	101
6.2 ANÁLISES DAS MULHERES DE FENÓTIPO CHE2 C5–, APÓS USO DE HRT.....	102
6.2.1 Médias das Variáveis da BChE Analisadas no Presente Estudo, antes do Uso de HRT com aquelas Obtidas após seu Uso.....	102
6.2.2 Comparação das Médias das Variáveis Obtidas antes do Uso de HRT, com aquelas Obtidas após seu Uso.....	103
6.2.3 Comparações Entre as Médias de CT, TG, LDL-C, HDL-C e E <sub>2</sub> antes e após o Uso de Tibolona .....	105
6.2.4 Comparação das Médias das Atividades Absolutas das 13 Bandas da BChE Obtidas antes e após o Uso de HRT .....	105
6.2.5 Análises de Correlação Simples, entre as Atividades da BChE e algumas Variáveis Analisadas ,após o Uso de HRT.....	107

6.2.6	Análises de Regressão Múltipla Escalonada em Amostras de Mulheres Climatéricas, após Uso de HRT, sem Uso de Tibolona .....	107
6.2.7	Análises de Correlação Simples Entre as Atividades das 13 Bandas da BChE e algumas Variáveis Analisadas, Obtidas em Amostras de 29 Mulheres Climatéricas após o Uso de HRT sem uso de Tibolona .....	108
6.2.8	Análises de Regressão Múltipla Escalonada em Amostra de 29 Mulheres Climatéricas após o Uso de HRT sem Uso de Tibolona .....	108
6.3	ANÁLISES DAS 6 MULHERES CLIMATÉRICAS DE FENÓTIPO CHE2 C5+, ANTES E APÓS USO DE HRT.....	109
6.3.1	Comparação das Médias das Variáveis Analisadas entre os Fenótipos CHE2 C5– e CHE2 C5+ .....	109
6.3.2	Comparação das Médias da ABChE e ARC5 antes e após Uso de HRT....	109
6.3.3	Análises de Correlação Simples entre as Atividades da BChE e ARC <sub>5</sub> com as demais Variáveis, em 6 Mulheres Climatéricas de Fenótipo CHE2 C5+, antes e após o Uso de HRT.....	110
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>111</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>112</b>
<b>9</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>127</b>



## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – MASSA MOLECULAR RELATIVA DA BChE HUMANA .....	8
TABELA 2 – VALORES DE REFERÊNCIA DO FSH .....	29
TABELA 3 – VALORES DE REFERÊNCIA DO E <sub>2</sub> .....	29
TABELA 4 – VALORES DE REFERÊNCIA DO LH .....	30
TABELA 5 – VALORES DE REFERÊNCIA DA PROGESTERONA .....	30
TABELA 6 – VALORES DE REFERÊNCIA DA TESTOSTERONA .....	30
TABELA 7 – RISCO RELATIVO DOS DIFERENTES EVENTOS CLÍNICOS APRESENTADOS PELO ESTUDO WHI NO GRUPO DE MULHERES PÓS-MENOPAUSADAS, NÃO HISTERECTOMIZADAS SUBMETIDAS A HRT ESTRO-PROGESTATIVA COMBINADA CONTÍNUA .....	33
TABELA 8 – COMPRIMIDOS DE ESTRÓGENOS .....	39
TABELA 9 – COMBINAÇÕES ESTRÓGENO/OUTRAS SUBSTÂNCIAS .....	39
TABELA 10 – EMPLASTROS DE ESTRÓGENOS .....	40
TABELA 11 – EMPLASTROS DE ESTRÓGENOS E PROGESTERONA COMBINADOS .....	40
TABELA 12 – ESTRÓGENOS EM CREMES VAGINAIS .....	40
TABELA 13 – OUTRAS FORMULAÇÕES NÃO HORMONAIS PARA USO DE HRT .....	41
TABELA 14 – VOLUMES DOS REAGENTES UTILIZADOS PARA O PREPARO DOS GÉIS DE POLIACRILAMIDA .....	58
TABELA 15 – MÉDIAS (M) ± DESVIOS PADRÕES (DP) E AMPLITUDES DE VARIAÇÃO (AV) DE ALGUMAS VARIÁVEIS ANALISADAS NO PRESENTE ESTUDO, EM 54 MULHERES CLIMATÉRICAS DE FENÓTIPO CHE2 C5–, ANTES DO USO DE HRT .....	63
TABELA 16 – ANÁLISES DE CORRELAÇÃO SIMPLES ENTRE AS ATIVIDADES DA BChE E ALGUMAS VARIÁVEIS ANALISADAS NO PRESENTE ESTUDO, EM 54 MULHERES CLIMATÉRICAS DE FENÓTIPO CHE2 C5–, ANTES DO USO DE HRT .....	65

TABELA 17 – CORRELAÇÕES SIMPLES ENTRE ALGUMAS VARIÁVEIS ANALISADAS NO PRESENTE TRABALHO, DE 54 MULHERES CLIMATÉRICAS DE FENÓTIPO CHE2 C5–, ANTES DO USO DE HRT .....	66
TABELA 18 – ANÁLISES DE REGRESSÃO MÚLTIPLA ESCALONADA, TENDO AS VARIÁVEIS DA BChE COMO DEPENDENTES, EM AMOSTRAS DE 54 MULHERES CLIMATÉRICAS DE FENÓTIPO CHE2 C5–, ANTES DO USO DE HRT.....	68
TABELA 19 – CORRELAÇÕES SIMPLES ENTRE AS ATIVIDADES DAS 13 BANDAS DA BChE E ALGUMAS VARIÁVEIS ANALISADAS OBTIDAS DE 54 MULHERES CLIMATÉRICAS DE FENÓTIPOS CHE2 C5–, ANTES DO USO DE HRT .....	70
TABELA 20 – ANÁLISES DE REGRESSÃO MÚLTIPLA ESCALONADA, TENDO AS ATIVIDADES TOTAIS DAS 13 BANDAS DA BChE COMO DEPENDENTES E COMO INDEPENDENTES ALGUMAS VARIÁVEIS, EM AMOSTRAS DE 54 MULHERES CLIMATÉRICAS DE FENÓTIPO CHE2 C5–, ANTES DO USO DE HRT .....	72
TABELA 21 – MÉDIAS (M) E RESULTADOS DE TESTES t DE ALGUMAS VARIÁVEIS ANALISADAS, ENTRE UMA MULHER CLIMATÉRICA DE FENÓTIPO CHE2 C5– ANTES DO USO DE HRT, QUE APRESENTOU BANDA EXTRA E 53 MULHERES CLIMATÉRICAS DE FENÓTIPO CHE2 C5– QUE NÃO APRESENTARAM ESTA BANDA .....	74
TABELA 22 – ANÁLISES DE CORRELAÇÃO SIMPLES, ENTRE OS NÍVEIS DOS ESTRÓGENOS E ALGUMAS VARIÁVEIS, EM MULHERES CLIMATÉRICAS, ANTES E APÓS O USO DE HRT .....	75
TABELA 23 – MÉDIAS (M) ± DESVIOS PADRÕES (DP) E RESULTADOS DE TESTES t, DAS ATIVIDADES DA BChE EM 45 MULHERES CLIMATÉRICAS DE FENÓTIPO CHE2 C5–, ANTES E APÓS O USO DE HRT .....	76

TABELA 24 – MÉDIAS (M) $\pm$ DESVIOS PADRÕES (DP), AMPLITUDES DE VARIAÇÃO (AV) E RESULTADOS DE TESTES t DE ALGUMAS VARIÁVEIS EM MULHERES CLIMATÉRICAS DE FENÓTIPO CHE2 C5–, ANTES E APÓS O USO DE HRT .....	78
TABELA 25 – MÉDIAS (M) $\pm$ DESVIOS PADRÕES (DP), AMPLITUDES DE VARIAÇÃO (AV) E RESULTADOS DE TESTES t DE ALGUMAS VARIÁVEIS EM 14 MULHERES CLIMATÉRICAS DE FENÓTIPO CHE2 C5–, ANTES E APÓS O USO DE TIBOLONA .....	80
TABELA 26 – MÉDIAS (M) $\pm$ DESVIOS PADRÕES (DP), AMPLITUDES DE VARIAÇÃO (AV) E RESULTADOS DE TESTES t DAS ATIVIDADES TOTAIS (KU/L) DAS 13 BANDAS DA BChE OBTIDAS EM MULHERES CLIMATÉRICAS DE FENÓTIPO CHE2 C5–, ANTES E APÓS O USO DE HRT .....	81
TABELA 27 – RESULTADOS DAS ANÁLISES DE CORRELAÇÃO SIMPLES, ENTRE AS ATIVIDADES DA BChE E AS DEMAIS VARIÁVEIS, EM 45 MULHERES MENOPAUSADAS DE FENÓTIPO CHE2 C5–, APÓS O USO DE HRT .....	83
TABELA 28 – RESULTADOS DAS ANÁLISES DE CORRELAÇÃO SIMPLES, ENTRE AS ATIVIDADES DA BChE E AS DEMAIS VARIÁVEIS, EM 31 MULHERES MENOPAUSADAS DE FENÓTIPO CHE2 C5–, APÓS HRT SEM O USO DE TIBOLONA .....	84
TABELA 29 – ANÁLISES DE REGRESSÃO MÚLTIPLA ESCALONADA, TENDO AS VARIÁVEIS DA BChE COMO DEPENDENTES, EM AMOSTRAS DE 31 MULHERES CLIMATÉRICAS DE FENÓTIPO CHE2 C5–, APÓS O USO DE HRT SEM TIBOLONA .....	85
TABELA 30 – CORRELAÇÕES SIMPLES ENTRE AS ATIVIDADES DAS 13 BANDAS DA BChE E ALGUMAS VARIÁVEIS, OBTIDAS EM AMOSTRAS DE 29 MULHERES CLIMATÉRICAS DE FENÓTIPOS CHE2 C5–, APÓS O USO DE HRT SEM TIBOLONA .....	86

TABELA 31 – ANÁLISES DE REGRESSÃO MÚLTIPLA ESCALONADA, TENDO AS ATIVIDADES DAS 13 BANDAS DA BChE COMO DEPENDENTES E COMO INDEPENDENTES AS DEMAIS VARIÁVEIS, EM AMOSTRA DE 29 MULHERES CLIMATÉRICAS DE FENÓTIPO CHE2 C5–, APÓS USO DE HRT SEM TIBOLONA .....	88
TABELA 32 – MÉDIAS (M) $\pm$ DESVIOS PADRÕES (DP), AMPLITUDES DE VARIAÇÃO (AV) E RESULTADOS DE TESTES t DE ALGUMAS VARIÁVEIS EM 54 MULHERES CLIMATÉRICAS DE FENÓTIPO CHE2 C5– E 6 DE FENÓTIPO CHE2 C5+ ANTES DO USO DE HRT .....	90
TABELA 33 – MÉDIAS (M) $\pm$ DESVIOS PADRÕES (DP), AMPLITUDES DE VARIAÇÃO (AV) E RESULTADOS DE TESTES t DA ABChE E ARC <sub>5</sub> EM 5 MULHERES CLIMATÉRICAS DE FENÓTIPO CHE2 C5+, ANTES E APÓS O USO DE HRT .....	90
TABELA 34 – ANÁLISES DE CORRELAÇÃO SIMPLES, ENTRE ARC <sub>5</sub> COM ALGUMAS VARIÁVEIS EM MULHERES CLIMATÉRICAS DE FENÓTIPO CHE2 C5+, ANTES E APÓS A HRT .....	91

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – LOCALIZAÇÃO CROMOSSÔMICA DO GENE DA BUTIRILCOLINESTERASE HUMANA .....	10
FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO DAS DEFINIÇÕES CRONOLÓGICAS DA MENOPAUSA .....	22
FIGURA 3 – APARATO PARA ELETROFORESE EM GEL DE ÁGAR .....	54
FIGURA 4 – FRAGMENTO DE UMA ELETROFORESE EM GEL DE ÁGAR, pH 6,5, MOSTRANDO O DESLOCAMENTO DAS BANDAS DE INDIVÍDUOS CHE2 C5+ (1 A 3) PARA O PÓLO POSITIVO E A FALTA DAS BANDAS EM INDIVÍDUOS DE FENÓTIPO CHE2 5– (4 E 5) .....	55
FIGURA 5 – FRAGMENTO DE ELETROFORESE EM GEL DE ÁGAR, pH 5,3, ONDE SE PODE OBSERVAR O DESLOCAMENTO DAS BANDAS C <sub>4/5</sub> E C <sub>5</sub> DE INDIVÍDUOS DE FENÓTIPO CHE2 C5+ (1 A 3) PARA O PÓLO (+) ASSIM COMO DAS BANDAS C <sub>4/5</sub> DE INDIVÍDUOS DE FENÓTIPO CHE2 C5– (4 E 5), ENQUANTO AS OUTRAS FORMAS MOLECULARES (C <sub>OF</sub> ) MOVEM-SE PARA O PÓLO (-).....	56
FIGURA 6 – APARATO PARA ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA .....	59
FIGURA 7 – FRAGMENTO DE ELETROFORESE, EM GEL DE POLIACRILAMIDA, MOSTRANDO AS 11 BANDAS (B1 - B11) VISUALIZADAS NAS CONCENTRAÇÕES DE 7 E 11%.....	60
FIGURA 8 – FRAGMENTO DE ELETROFORESE, EM GEL DE POLIACRILAMIDA, MOSTRANDO AS 13 BANDAS (B1 - B11 MAIS B1A E B1B) VISUALIZADAS NAS CONCENTRAÇÕES DE 7 E 11%. .....	69
FIGURA 9 – FRAGMENTO DE ELETROFORESE EM GEL DE ÁGAR pH 6,5, MOSTRANDO AS BANDAS EXTRAS DAS DUAS (PRIMEIRA E SEGUNDA) COLETAS .....	73


GRÁFICO 1 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS PORCENTAGENS DOS VALORES MÉDIOS ALTERADOS EM DIFERENTES ANÁLISES, NAS 54 MULHERES CLIMATÉRICAS .....	64
GRÁFICO 2 – REPRESENTAÇÕES ESQUEMÁTICAS DAS ATIVIDADES DA BChE, OBTIDAS EM AMOSTRAS DE 45 MULHERES CLIMATÉRICAS, ANTES E APÓS HRT .....	77
GRÁFICO 3 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE ALGUMAS VARIÁVEIS ANALISADAS NO PRESENTE ESTUDO, NAS AMOSTRAS DE MULHERES CLIMATÉRICAS, ANTES E APÓS HRT .....	79
GRÁFICO 4 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE ALGUMAS VARIÁVEIS ANALISADAS NO PRESENTE ESTUDO, NAS AMOSTRAS DE MULHERES CLIMATÉRICAS, ANTES E APÓS HRT .....	79
GRÁFICO 5 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS ATIVIDADES DAS 13 BANDAS QUE APARECERAM NAS AMOSTRAS DE MULHERES CLIMATÉRICAS, EM GEL DE POLIACRILAMIDA, ANTES E APÓS HRT .....	82
GRÁFICO 6 - ILUSTRAÇÃO DAS CORRELAÇÕES DE $ARC_5$ COM IMC, CT E TG EM MULHERES CLIMATÉRICAS DE FENÓTIPO CHE2 C5+, ANTES (A) E APÓS (B) O USO DE HRT.....	92

## LISTA DE ABREVIATURAS

AAS	- Ácido Acetil Salicílico
ABESO	- Associação Brasileira de Estudos da Obesidade
AR	- Atividade Relativa
AChE	- Acetilcolinesterase
ALP	- Fosfatase Alcalina
ALT	- Alanina Aminotransferase
MPA	- Acetato de Medroxiprogesterona
AST	- Aspartato Aminotransferase
AT	- Atividade Total
AV	- Amplitude de Variação
AVC	- Acidente Vascular Cerebral
BChE	- Butirilcolinesterase
<i>BCHE</i>	- Loco da BChE
CEE	- Estrógeno Conjugado Equino
CEP-HC	- Comitê de Ética em Pesquisa – Hospital de Clínicas
<i>CHE2</i>	- Loco <i>CHE2</i>
CHE2 C5+	- Fenótipo C5+
CHE2 C5-	- Fenótipo C5–
CNPq	- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
CT	- Colesterol
CREA	- Creatinina
CYS	- Cisteína
DAC	- Doença Arterial Coronariana
DCV	- Doença Cardio Vascular
DNA	- Ácido Desoxiribonucléico
DP	- Desvio Padrão
DSMB	- <i>Date Safety Monitoring Board</i>
DTNB	- Ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico
E <sub>1</sub>	- Estrona
E <sub>2</sub>	- Estradiol



E <sub>3</sub>	- Estriol
EDTA	- Ácido Etilenodiamino Tetracético
ELFA	- <i>Enzyme Linked Fluorescent Assay</i>
EM	- Estradiol + Medroxiprogesterona
EN	- Estradiol + Norestisterona
EUA	- Estados Unidos da América
FDA	- <i>Federal Register: Rules and Regulations</i>
FEBRASGO	- Federação Brasileira de Ginecologia e Obstetricia
FMP	- Final dos Períodos Menstruais
FSH	- Hormônio Folículo Estimulante
FUNPAR	- Fundação da Universidade Federal do Paraná
G	- Formas Globulares da BChE
G3P	- Glicose-3-Fosfato
GGT	- Gama Glutamiltransferase
GLC	- Glicose
GLU	- Ácido Glutâmico
hBChE	- Butirilcolinesterase humana
Hb	- Hemoglobina
Hc	- Hematócrito
HDL-C	- Colesterol da Lipoproteína de Alta Densidade
HIS	- Histidina
HRT	- Terapia de Reposição Hormonal
HuAChE	- Acetilcolinesterase Humana
IDL	- Lipoproteína de Densidade Intermediária
IMC	- Índice de Massa Corporal
IMS	- <i>International Menopause Society</i>
IUBMB	- <i>International Union of Biochemistry and Molecular Biology</i>
IUPAC	- <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LDL-C	- Colesterol da Lipoproteína de Baixa Densidade
LH	- Hormônio Luteinizante
MoAChE	- Acetilcolinesterase de Rato
MPA	- Acetato de Medroxiprogesterona

N	- Número da Amostra
NAMS	- <i>The North American Menopause Society</i>
NC-IUBMB	- <i>Nomenclature Comitee of International Union of Biochemistry and Molecular Biology</i>
	- <i>National Institute of Health</i>
P. A.	- Para Análise
PDB	- <i>Book Have Protein Databank</i>
p/v	- Peso por Volume
3q	- Braço Longo do Cromossoma 3
q.s.p.	- Quantidade Suficiente Para
SC	- Santa Catarina
seg	- Segundos
STRAW	- <i>Stages of Reproductive Aging Workshop</i>
TcAChE	- AChE do <i>Torpedo Californica</i>
TG	- Triglicérides
T <sub>3</sub> L	- Triiodotironina Livre
T <sub>4</sub> L	- Tiroxina Livre
TSH	- Hormônio Estimulante da Tireóide
UFPR	- Universidade Federal do Paraná
U. P.	- Ultra Puro
VLDL-C	- Colesterol da Lipoproteína de Muito Baixa Densidade
VR	- Valor de Referência
VA	- Volume da Amostra
VD	- Variáveis Dependentes
VT	- Volume Total
v/v	- Volume por Volume
WHI	- <i>Women's Health Initiative</i>

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\alpha$	- Alfa
$\Delta A$	- Variação em Absorbância
Å	- Angström
$\beta$	- Beta
°C	- Grau Centígrado
d	- Diâmetro
dL	- Decilitro
g	- Grama
H <sub>2</sub> O	- Água
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	- Água Oxigenada
kb	- Quilobase
kg	- Quilograma
kDa	- Quilodalton
kU	- Quilo Unidades
L	- Litro
m <sup>2</sup>	- Metro Quadrado
$\mu$ L	- Microlitro
mcg	- Microgramas
mg	- Miligramas
mm	- Milímetros
mA	- Miliampères
mL	- Mililitros
mM	- Milimol
mUI	- Miliunidades Internacionais
M	- Mol
ng	- Nanograma
nm	- Nanômetro
pg	- Picograma
pmol	- Picomol
PM	- Peso Molecular
r	- Coeficiente de Correlação

$r^2$	- Coeficiente de Determinação
Ro2-0683	- Dimetilcarbamato do Brometo de 2-hidroxi-5-fenil-benziltrimetilamônio
U	- Unidade
UI	- Unidades Internacionais
V	- Volts
x	- Multiplicado Por
$\chi^2$	- Teste do Qui-quadrado
>	- Maior Que
<	- Menor Que
$\pm$	- Mais ou Menos
®	- Marca Registrada
-	- Negativa
%	- Por Cento
+	- Positiva
=	- Igual a

## RESUMO

O presente trabalho investigou a relação entre as atividades totais (ABChE) e das diferentes formas moleculares da BChE (EC 3.1.1.8), obtidas após eletroforese em gel de ágar ( $ARC_{4/5}$ ,  $AAC_{4/5}$ ,  $AAC_{OF}$ ,  $ARC_5$ ) e gel de poliacrilamida (AB1, AB1A, AB1B, AB2, AB3, AB4, AB5, AB6, AB7, AB8, AB9, AB10, AB11) com dados bioquímico-hormonais e IMC obtidos de 60 mulheres climatéricas, euro-brasileiras, com idade média de 52,4 anos. Os dados foram obtidos em duas etapas: a primeira, sem que as mulheres houvessem feito uso de HRT e a segunda, após o uso de HRT. Em mais de 85% delas foram evidenciadas duas bandas adicionais na eletroforese em gel de poliacrilamida, sugerindo um envolvimento dessas com o aumento da idade ou fatores a ele relacionados. Uma delas apresentou banda extra na eletroforese em gel de ágar-ácido e maiores valores de LDL-C e TG sugerindo associação dessa banda com dislipidemia. Foram determinados os fenótipos do loco *CHE2* dessas mulheres, obtendo-se a frequência de  $10\% \pm 3,9\%$  para o fenótipo *CHE2 C5+*. Nas análises realizadas antes da HRT, observaram-se aumentos de ABChE,  $ARC_{4/5}$ ,  $AAC_{4/5}$ ,  $AAC_{OF}$ , IMC, CT, TG, LDL-C e diminuição de HDL-C nas mulheres climatéricas quando comparadas com as não climatéricas. Nas mulheres de fenótipo *CHE2 C5-*, que utilizaram HRT sem Tibolona, verificou-se uma redução nos níveis de CT e aumentos de  $E_2$  de modo significativo. As que utilizaram Tibolona mostraram uma tendência para aumentos de CT, LDL-C e diminuições de HDL-C. Assim, a Tibolona não pareceu mostrar-se eficaz na melhora do perfil lipídico. Os níveis médios de GLC,  $T_3$ , atividades total da BChE e complexos  $C_{4/5}$  e  $C_{OF}$  diminuíram significativamente, independente do hormônio utilizado. As atividades das diferentes bandas eletroforéticas da BChE correlacionam-se de forma diversa com as variáveis analisadas (bioquímico-hormonais, idade, IMC), dependendo das alterações metabólicas que ocorrem no organismo antes e após HRT, sugerindo a importância de se analisar o comportamento das diferentes frações. Após HRT, houve reduções significativas das atividades de B1, B1A, B7, B8 e B10. A banda B9 apresentou aumento de sua atividade com o uso de Tibolona. Nas mulheres de fenótipo *CHE2 C5+* só foram observadas correlações de  $ARC_5$  com IMC (-), CT (-), TG (-), evidenciando a associação da atividade relativa do complexo  $C_5$  com o metabolismo dos lípides.

## ABSTRACT

The present study investigated the relationship between total activity (ABChE) and the activities of the different BChE (EC 3.1.1.8) molecular forms, obtained after electrophoresis in agar gel (ARC<sub>4/5</sub>, AAC<sub>4/5</sub>, AAC<sub>OF</sub>, ARC<sub>5</sub>) and polyacrilamde gel (AB1, AB1A, AB1B, AB2, AB3, AB4, AB5, AB6, AB7, AB8, AB9, AB10, AB11), with biochemist-hormonal and BMI data obtained from 60 Euro-Brazilian climateric women, aged 52.4 years old. The data were obtained in two stages: firstly, without the use of HRT and secondly, after the use of HRT. In more than 85% of these women two additional bands appeared in the polyacrilamde gel electrophoresis, suggesting a relation of them with increasing age or factors related to it. One of these women presented an extra band in agar acid gel electrophoresis. She showed increased values of LDL-C and TG as compared the other, suggesting association of this band with dislipidemic. The *CHE2* locus phenotypes were determined and the frequency of the CHE2 C5+ phenotype was 10% ± 3,9%. Before HRT use, most CHE2 C5– climateric women showed increases in ABChE, ARC<sub>4/5</sub>, AAC<sub>4/5</sub>, AAC<sub>OF</sub>, IMC; CT, TG and LDL-C and decreases of HDL-C as compared with no climateric women. After the use of HRT without Tibolona, presented decrease in CT levels and increase in E<sub>2</sub> levels were observed. The women who used HRT with Tibolona showed a tendency for CT and LDL-C increases and decreases of HDL-C. So, the use of Tibolona did not improv the lipidic profile. The mean levels of GLC and T<sub>3</sub>L decreased independently of the hormone used. The activities of the different electrophoretic bands of BChE are differently correlated with the analyzed variables (biochemist-hormonal, age, BMI), depending on metabolic alterations that occur in the organism before and after HRT, suggesting the importance of analyzing the behavior of the different fractions. Significant reductions of the activities of B1, B1A, B7, B8 and B10 were seen after the use of HRT. The B9 band presented increase of its activity with the use of Tibolona. In the CHE2 C5+ climateric women, correlations of ARC<sub>5</sub> were only observed with IMC (–), CT (–) and TG (–), showing the association between C<sub>5</sub> complex activity and the lipid metabolism.

## 1 INTRODUÇÃO

A butirilcolinesterase (BChE), também conhecida como colinesterase do soro ou pseudocolinesterase, é uma enzima presente no soro humano, sintetizada em diversos tecidos do organismo especialmente pelo fígado.

A estrutura da enzima é codificada pelo loco *BCHE* o qual está localizado no braço longo do cromossomo 3. A BChE apresenta-se no sangue humano em várias formas moleculares. Pode apresentar-se apenas como BChE (monômero, dímero, trímero ou tetrâmero), ou compor formas heterólogas, nas quais está associada a outras substâncias. O maior número de bandas da BChE foi detectado em eletroforese de poliacrilamida (12 bandas), o que nos leva a inferir a provável existência de 8 formas heterólogas dessa enzima. Algumas formas heterólogas são C<sub>2</sub> (monômero-albumina) e C<sub>5</sub> (BChE ligada à substância desconhecida). O complexo C<sub>5</sub> é dependente da interação entre o gene *BCHE* e o gene *CHE2*. Os fenótipos de *CHE2* são classificados como CHE2 C5+ (presente em cerca de 10% das amostras Euro-brasileiras) e CHE2 C5-, pela presença ou não, respectivamente, do complexo C<sub>5</sub>. Em eletroforese feita com gel de ágar em pH 6,7, somente a banda C<sub>5</sub> corre para o pólo positivo, enquanto todas as outras formas moleculares (C<sub>OF</sub>) correm juntas para o pólo negativo.

O uso da succinilcolina como relaxante muscular pré-operatório, na década de 50, possibilitou a descoberta da variabilidade da BChE. A primeira enzima variante descrita (atípica) não consegue hidrolisar esse relaxante, em doses fisiológicas, o que causa, nos pacientes, paralisia muscular e apnéia prolongada.

Os primeiros trabalhos de pesquisa envolvendo a BChE relacionavam alterações entre sua atividade no organismo humano e a resposta deste, a relaxantes musculares contendo succinilcolina. A medida que pesquisas específicas à enzima foram sendo desenvolvidas, inúmeros relatos de aumentos e diminuições da atividade da BChE foram se avolumando na literatura. Apesar de todas essas pesquisas, sua função não está completamente elucidada.

A atividade da enzima está aumentada nas hiperlipidemias, hipertireoidismo, obesidade e com a diminuição dos níveis de estrógenos. Diminuições da atividade são encontradas em doenças hepáticas, doenças renais e uso de contraceptivos orais e compostos tóxicos contendo organofosforados.



Trabalhos iniciados na década de 70 identificaram que variações nos níveis de  $E_2$  eram acompanhadas de variações na atividade da BChE. O  $E_2$ , que é um hormônio esteróide derivado do CT e influencia o desenvolvimento das características sexuais secundárias femininas, tem sua concentração diminuída no climatério.

O termo Menopausa é utilizado universalmente para definir o período de tempo em que a mulher começa a apresentar alterações nos episódios menstruais que culminam com a sua interrupção. Mulheres chegam à menopausa normalmente de forma espontânea com idades que variam de 42 a 58 anos, em média 51 anos. A menopausa pode ainda ser induzida (remoção cirúrgica de ovários e/ou útero) ou por ablação iatrogênica da função ovariana (quimioterapia ou radiação pélvica) e é caracterizada pelo fim da fase reprodutiva na mulher.

As fases da menopausa podem ser classificadas em diferentes estágios. O período de transição da menopausa é definido como o estágio que envolve os 2 anos que antecedem o aparecimento de irregularidades no ciclo menstrual, até 1 ano depois de cessada completamente a menstruação (menopausa propriamente dita). Nessa fase, ocorrem declínios da função ovariana, com aumentos de FSH (Hormônio Folículo Estimulante) e diminuições na produção de  $E_2$ . O espaço de tempo que define os anos que se seguem à menopausa é chamado de pós-menopausa.

Durante este período de falência ovariana é que as mulheres começam a relatar sintomas. Inúmeras alterações físicas e clínicas ocorrem no organismo feminino, algumas secundárias à privação dos estrógenos, outras devido a fatores psicológicos, sociais e culturais.

A menopausa tem sido estudada, baseada nos sintomas clínicos, mas terapias que propõem uma condição de vida mais saudável às mulheres nesse período têm sido propostas. A Terapia de Reposição Hormonal (HRT) é indicada na tentativa de reverter muitos dos sintomas e prevenir enfermidades associadas à menopausa. Isso resulta em significativo impacto, tanto na melhoria de qualidade de vida dessas mulheres, como na redução de custos da saúde pública pela redução de morbidade.

O avanço da ciência e a melhoria das condições de vida proporcionaram um aumento na expectativa de vida ao nascer. Dados da Organização Mundial da

Saúde relatam que, em 1998, mais de 447 milhões de mulheres chegaram à menopausa em todo o mundo, tendo uma expectativa de vida em torno de 65 anos na maioria dos países e 79 anos nos países do primeiro mundo. Para 2025, estima-se um aumento para 1,1 bilhão de mulheres, sendo a expectativa de vida de 82 anos nos países desenvolvidos e em torno de 72 no resto do mundo. No Brasil, segundo dados do IBGE, a expectativa de vida das mulheres passou de 65,5 anos em 1980 para 72,25 anos em 2000 e será de 74,41 anos em 2020. A população feminina com idade superior a 45 anos no Brasil passou de 9.375.941 em 1980 (15,56% do total da população feminina) para 17.500.981 (20,30%) em 2.000.

Embora existam inúmeros estudos que envolvem a BChE ao longo das últimas décadas, cientistas ainda se perguntam qual a função da BChE no organismo. No presente trabalho, serão realizadas diversas análises de forma a verificar alterações na atividade da BChE, principalmente no comportamento de suas diferentes formas moleculares, em mulheres climatéricas antes e após uso de HRT (Terapia de Reposição Hormonal). Isso permitirá estabelecer correlações entre as atividades da BChE, o IMC e os diversos caracteres bioquímicos analisados antes e após o uso de HRT.

Nessa perspectiva, acreditamos que dados a mais, acrescidos aos já existentes, possam contribuir cientificamente, tanto para o esclarecimento da função da BChE, como para esclarecimento das alterações sofridas pelo organismo feminino durante a HRT.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 COLINESTERASES

O termo colinesterase é reservado às esterases inibidas pela fisostigmina na concentração de  $10^{-5}$  M (AUGUSTINSSON, 1963). Nos eucariotos há muitos tipos de esterases, divididas em grupos com bases na especificidade a diferentes substratos. Várias, incluindo a butirilcolinesterase, são classificadas como carboxilesterases não específicas, divididas em grupos com base nos valores diferenciais de inibição dos organofosforados.

DALE (1914), descobriu que a ação da acetilcolina no coração de sapos tinha vida curta e sugeriu que uma enzima estava presente no soro e hidrolisava os ésteres de colina. Nesse tempo, várias esterases já haviam sido descritas em diferentes tecidos animais, o que fazia supor que a acetilcolina deveria ser excepcionalmente resistente à ação das mesmas.

STEDMANN; STEDMANN; EASSON (1932) mostraram que esterases de fígado de porco e gato eram incapazes de catalisar a hidrólise da acetilcolina e procuraram por uma enzima responsável por essa hidrólise. Eles descreveram e purificaram pela primeira vez uma enzima presente no soro de cavalo que catalisava a hidrólise da acetilcolina. Eles chamaram essa enzima de "choline-esterase".

Durante os anos seguintes, inúmeros trabalhos relataram enzimas que hidrolisavam a acetilcolina em vários órgãos e com diferentes concentrações de substrato. Uma explicação para isso foi encontrada por ALLES E HAWES<sup>1</sup>, citados por BROWN et al. (1981), que estudando sangue de pacientes alérgicos, demonstraram a existência de duas colinesterases: uma, cuja atividade era grande a baixa concentração do substrato, que era inibida pelo excesso de substrato e que estava presente no eritrócito humano; a segunda, cuja atividade modificava de acordo com a concentração do substrato estudado e que estava presente no soro humano.

Mais tarde, relatos de trabalhos usando enzimas purificadas. Sugeriram que a

<sup>1</sup>ALLES, G. A.; HAWES, R. R. Cholinesterase in blood of allergic patients. *Allergy*. [S.l.], v. 12, p. 1-5, 1940.

enzima eritrocitária era específica para ésteres de colina e podia ser chamada de colinesterase verdadeira, enquanto a enzima no soro que hidrolisava ésteres não colínicos, seria chamada de pseudo-colinesterase.

Em revisão feita por CHATONNET; LOCKRIDGE citados por GNATT et al. (1991), as esterases estão quimicamente classificadas em acetilcolinesterase (AChE, EC 3.1.1.7) e butirilcolinesterase (BChE, EC 3.1.1.8).

A AChE está predominantemente presente em terminações nervosas, substância cinzenta do cérebro, eritrócitos, pulmão, fígado e músculo (FULLER; BERGER, 1990; LI et al., 2000). Sua função é hidrolisar rapidamente a acetilcolina nas sinapses colinérgicas, produzindo ácido acético e colina (KAPLAN et al., 2002). Tem surpreendente poder catalítico, sendo altamente específica pelo substrato fisiológico acetilcolina, entretanto também catalisa reações com outros ésteres e amidas (EKHOLM, 2001). Em muitas espécies, a estrutura de raio X da AChE já é conhecida (KAPLAN et al., 2002): TcAChE (*Torpedo californica*); MoAChE (rato); HuAChE (humana); DAChE (*Drosófila*).

A BChE é sintetizada pelo fígado e encontrada em vários tecidos de vertebrados: fígado, intestino, pulmão, cérebro e soro (NACHON et al., 2002). Existem sugestões que esta enzima também seja sintetizada no tecido adiposo (ORES KOVIC; KUNEC-VAJIC, 1992; POPOVIC et al., 1998). Até o momento, a função fisiológica da BChE permanece indeterminada (FULLER; BERGER, 1990; LI et al., 2000; EKHOLM, 2001; NACHON et al., 2002).

Há estudos sugerindo o envolvimento dessas duas colinesterases no desenvolvimento do sistema nervoso, crescimento de células nervosas, regulação e proliferação celular e apoptose (LAYER, 2003).

Até hoje, muitos trabalhos não distinguem claramente uma da outra. As colinesterases mostram variações de estruturas quaternárias, com atividades catalíticas similares, mas com diferenças nas interações hidrofóbicas e parâmetros hidrodinâmicos. Historicamente, diferentes formas têm sido separadas por eletroforese.

<sup>2</sup>CHATONNET, A.; LOCKRIDGE, O. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. **Biochemistry Journal**, Washington, v. 260, p. 625-634, 1989.

Subunidades catalíticas, as quais variam nas glicosilações, podem estar organizadas como dímeros ou tetrâmeros, ganhando formas globulares que se dividem dependendo de sua capacidade anfifílica. Tetrâmeros são formados por interações eletrostáticas e hidrofóbicas entre dois dímeros ligados por duas pontes de dissulfeto (MASSON et al., 1991).

Embora as duas enzimas existam nas formas moleculares que incluem: monômeros, dímeros e complexos oligoméricos ligados a outros elementos, diferem na especificidade por diferentes substratos e na sensibilidade a diferentes inibidores (LOCKRIDGE et al., 1979).

## 2.2 BUTIRILCOLINESTERASE

### 2.2.1 Aspectos Gerais

Segundo a *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) e *Nomenclature Committee of International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (NC-IUBMB), a butirilcolinesterase (BChE) é uma enzima, cujos sinônimos são: pseudocolinesterase, butirilcolina esterase, colinesterase não específica, colinesterase II (inespecífica), benzoilcolinesterase, propionilcolinesterase, acilcolina acilhidrolase e BtChoEase; pertencente à classe das esterases, que catalisam reações tendo como substrato água e acilcolina e como produto, colina e ácido carboxílico (IUBMB, 2003).

A BChE hidrolisa os ésteres de colina, entretanto sua especificidade não é absoluta. Ela catalisa a hidrólise de butirilcolina assim como de outros ésteres alifáticos que não contém colina, tais como ácido acetilssalicílico (AAS; MASSON et al., 1998). Despertou particular interesse dos cientistas, também, porque hidrolisa os compostos tóxicos (SUN et al., 2001; NACHON et al., 2002).

### 2.2.2 Estrutura Molecular e Heterogeneidade da BChE

A BChE humana é um oligossacarídeo homotetrâmero altamente glicosilado, de 340 kDa, com 9 sítios de N-glicosilação por subunidade catalítica que representam 25% de sua massa (LOCKRIDGE; ECKERSON; LA DU, 1979; LOCKRIDGE et al., 1987). Essa alta glicosilação contribui para a sua longa permanência no sangue circulante e a protege da ação de enzimas proteolíticas (LIAO et al., 1992). Os insucessos nas tentativas de determinação da estrutura tridimensional e cristalização da enzima, também parecem estar ligados a alta glicosilação (NACHON et al., 2002).

A completa seqüência dos 574 aminoácidos da cadeia principal já foi determinada quimicamente e é codificada por 1722 nucleotídeos no DNA (ARPAG AUS et al., 1990). A essa cadeia principal estão ligadas 9 cadeias de oligossacarídeos por 9 resíduos de asparagina (Asp). A estrutura das cadeias de oligossacarídeos não foi determinada, mas há indícios que sejam cadeias do tipo complexo terminadas em ácido siálico (HAUPT et al., 1966).

Segundo BROWN et al. (1981), está bem estabelecido que a BChE humana é uma  $\alpha_2$ -globulina com baixa mobilidade eletroforética a pH 8,6. Por troca de pH, as propriedades eletroforéticas das proteínas são alteradas, fazendo com que a enzima em pH 11,0 migre como  $\beta$ -globulina, em pH 8,6 como  $\alpha_2$ -globulina, em pH 5,0 como albumina e em pH 4,2 como pré-albumina.

HARRIS; HOPKINSON; ROBSON (1962), utilizando eletroforese determinaram 4 componentes diferentes com atividades colinesterásicas, que foram denominadas C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> e C<sub>4</sub>, em ordem decrescente de mobilidade.

SCOTT; POWERS (1972) sugeriram que C<sub>4</sub> fosse um tetrâmero e C<sub>1</sub> um monômero. MASSON (1979) reafirmou que os parâmetros: peso, constante de sedimentação, volume específico, mobilidade eletroforética e ponto isoelétrico da BChE, determinados através de eletroforeses em gel de poliacrilamida e centrifugação por gradiente de sucrose, determinam as formas moleculares aparente das frações. Esses resultados indicam: que a forma das 4 principais frações seja elipsóide; que C<sub>1</sub> seja um monômero; C<sub>2</sub> seja um composto de C<sub>1</sub>, associado com uma pequena subunidade inativa, responsável pela sua propriedade elétrica, identificada mais tarde como sendo a albumina (MASSON, 1989); C<sub>3</sub>, seja um

dímero e  $C_4$ , o maior componente da enzima, seja um tetrâmero, arranjado como dímero de dímero (duas vezes a fração  $C_3$ ).

As formas moleculares  $C_1$ ,  $C_2$ ,  $C_3$  e  $C_4$  são parcialmente interconvertíveis e as formas  $C_1$  e  $C_3$  podem ser precursores e/ou produtos de degradação de  $C_4$  (LAMOTTA et al., 1968; MASSON, 1979).

As massas moleculares relativas das unidades purificadas da BChE humana, obtidas por diferentes metodologias, estão descritas na TABELA 1.

TABELA 1 - MASSA MOLECULAR RELATIVA DA BChE HUMANA

Banda Eletroforética	Valor (Dalton)	Método
$C_4$	300.000 345.000	Ultracentrifugação Eletroforese
$C_3$	170.000	Ultracentrifugação
$C_2$	110.000	Ultracentrifugação
$C_1$	86.000 85.000	Sephadex G200 Eletroforese

FONTE: BROWN et al. (1981)

Em eletroforese, uma forma adicional de mobilidade intermediária entre  $C_3$  e  $C_4$  é observada. Esta forma é progressivamente formada às custas de  $C_4$  por ação da tripsina, plasmina e certas proteases (SAEED; CHADWICK; MILL, 1971). A mesma foi relatada por MASSON; CHATONNET; LOCKRIDGE (1990) como um trímero. Segundo MASSON (1991) uma outra nomenclatura, baseada na estrutura molecular, seria mais conveniente do que a de acordo com suas mobilidades eletroforéticas. Recomendou as designações G (forma globular):  $G_1$ ,  $G_2$  e  $G_4$  de acordo com o número de subunidades, uma vez que  $C_1$ ,  $C_3$  e  $C_4$  são formas globulares de monômeros, dímeros e tetrâmeros da enzima. A forma  $C_2$  é referida como  $G_1$ -ALB, e o trímero como  $G_3$ .

Embora se tenha conhecimento do comportamento eletroforético da enzima e da seqüência de aminoácidos de sua cadeia principal, sua estrutura tridimensional ainda não é conhecida. O conhecimento da estrutura de uma enzima permite explicar as bases estruturais da reação que ela catalisa, permitindo planejar, executar e avaliar o tipo de reação.



Segundo MYERS; RICHMOND; OAKESHOTT (1988), várias hipóteses sobre a estrutura molecular da BChE vinham sendo propostas desde 1968, a maioria, comparando a similaridade de ação da BChE com proteases e serinas hidrolases frente a alguns inibidores. A ausência de estrutura de raios X da BChE conduzia para o uso da estrutura da AChE como modelo.

O centro ativo da BChE é constituído por 1 sítio esterásico e 1 sítio aniônico. O sítio aniônico liga-se com o grupo amônio quaternário (carga positiva) da colina (SUSSMAN et al., 1991). Estudos de mutagênese sítio-dirigida identificaram serina (Ser) 198, histidina (His) 438 e ácido glutâmico (Glu) 325, como a tríade catalítica que forma o sítio esteárico da BChE (SHAFFERMAN et al., 1992).

Um grande passo para o entendimento do mecanismo catalítico e modelo de ação das colinesterases frente aos seus inibidores foi dado por SUSSMAN et al. (1991), com a determinação da estrutura tridimensional da AChE do *Torpedo californica* (TcAChE). A seqüência, dos 575 aminoácidos, de cada subunidade da TcAChE já era conhecida. LOKRIDGE et al. (1987) haviam determinado a seqüência dos 574 aminoácidos de cada subunidade da BChE humana (hBChE) e haviam constatado que ambas, TcAChE e hBChE, possuíam 53,8% de seqüência idêntica. Esses dados permitiram a construção dos primeiros modelos tridimensionais da BChE em 1992, construídos por homologia com a TcAChE. Em 2001, EKHOLM construiu um modelo da BChE humana (hBChE) usando método de construção tridimensional, utilizando cristais de proteínas de famílias conhecidas como modelo. O modelo computadorizado da BChE foi construído por homologia, utilizando coordenadas da estrutura de raio X da TcAChE de 28Å. Resíduos 4-534 da AChE foram sucessivamente alinhados com os resíduos 2-532 da hBChE sem nenhuma deleção ou adição. 20 fragmentos selecionados do *Book Haven Protein Databank* (PDB) foram inseridos no modelo em várias regiões. Os últimos aminoácidos 533-574 não foram introduzidos no modelo por serem insignificantes na investigação do sítio ativo.

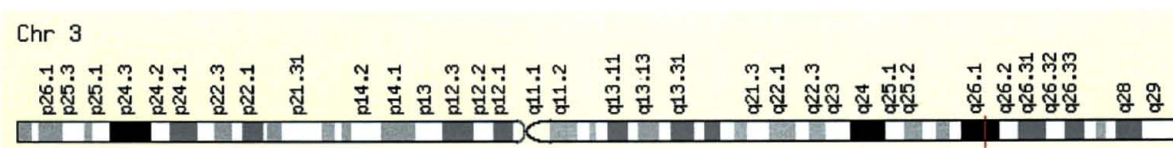
O resultado foi obtido utilizando programa MODELLER para construir o modelo. Átomos de hidrogênio foram adicionados ao modelo em padrões geométricos. O modelo obtido da estrutura da BChE ficou próximo ao da AChE. Porém, entre outras comparações, o resultado obtido apoia o ponto de vista de que o centro ativo da AChE e BChE diferem especialmente na presença de uma larga

cavidade na BChE. O modelo permitiu as seguintes deduções com relação à estrutura da BChE: possui um canal que leva ao sítio ativo similar ao existente na AChE, porém mais largo e formado por peptídeos NH (função de amino-ácido) e com poucos resíduos aromáticos (o canal da AChE é estreito e com muitos resíduos aromáticos); somente uma forte ponte de hidrogênio pode ser formada no sítio ativo (AChE forma duas pontes) e comparando o volume de interações de Van der Waals das moléculas, há indícios de que a AChE seja menor e talvez mais rígida do que a BChE. Embora não seja satisfatório para a engenharia da enzima, a estrutura encontrada, contribui para entender alguns aspectos das diferenças de especificidade entre AChE e BChE frente aos diferentes substratos.

### 2.2.3 Locos Determinantes das Variações da BChE

As variações genéticas da BChE são condicionadas por dois locos autossômicos não ligados *BCHE* e *CHE2* (HARRIS et al., 1963). O loco *BCHE* codifica a estrutura da enzima e de acordo com o GenomaBank este loco está localizado no braço longo do cromossomo 3 na posição 3q26.1-q26.2 (FIGURA 1), com  $171.982.498 \pm 32$  bases (SPARKES et al., 1984). O gene *CHE2* determina a produção de um componente extra da enzima (banda C<sub>5</sub> na eletroforese) e aparece em cerca de 10% da população em geral. Segundo EIBERG et al. (1989), há evidências de que esse gene esteja ligado ao cromossoma 2 nas posições 2q33-q35 conhecido como conjunto gênico CRYG ( $\gamma$ -Cristallin cluster).

FIGURA 1 – LOCALIZAÇÃO CROMOSSÔMICA DO GENE DA BUTIRILCOLINESTERASE HUMANA



FONTE: PUBMED.

### 2.2.3.1 Loco *BCHE*

A introdução da succinilcolina como relaxante muscular pré-anestésico na década de 50 deu início, nos anos seguintes, a inúmeros trabalhos que relatavam respostas atípicas ao uso de succinilcolina, e possibilitou a descoberta das variantes do loco *BCHE*.

KALOW; STARON (1957), estudando casos de pacientes que durante o uso da succinilcolina apresentaram apnéia prolongada, descobriram, utilizando métodos de inibição à dibucaína, a primeira variante genética da BChE (atípica).

A succinilcolina é um relaxante muscular utilizado como pré-anestésico, que quando administrado endovenosamente na proporção de 1mg/kg, relaxa a musculatura da laringe, facilitando a passagem do tubo endotraqueal. O efeito da succinilcolina é moderadamente seletivo pois relaxa também a maioria dos músculos do corpo, incluindo diafragma e músculos do peito. O efeito relaxante é curto, 2 a 10 minutos. A succinilcolina age competindo com a acetilcolina nos receptores das junções neuromusculares, ambos causam a despolarização das fibras musculares. A acetilcolina é rapidamente destruída pela AChE, entretanto, a succinilcolina não, e sua ação permanece até que uma larga porção tenha sido hidrolisada no plasma pela BChE. Na presença da baixa atividade enzimática da BChE, a destruição da succinilcolina é diminuída, resultando num período longo de paralisia dos músculos, e conseqüente apnéia (SHNIDER, 1975).

Outros inibidores também foram utilizados, entre eles Ro2-0683, que se trata do dimetilcarbamato do brometo de 2-hidroxi-5-fenil-benziltrimetilamônio (MORROW; MOTULSKY, 1968), fluoreto de sódio (NaF; HARRIS; WHITTAKER, 1963) e propranolol (WHITTAKER; BRITTEN; WICKS, 1981). Esses inibidores têm sido usados em metodologias que empregam diferentes substratos, contendo ou não grupamento colina, como benzoilcolina, alfa-naftilacetato e inúmeros ésteres de tiocolina como propioniltiocolina e butiriltiocolina. Alguns fenótipos (*BCHE* UF, *BCHE* UA) podem ser previamente identificados utilizando-se o alfa-naftilacetato como substrato e uma combinação dos inibidores DL-propranolol e Ro2-0683 (ALCÂNTARA; CHAUTARD-FREIRE-MAIA; CULPI, 1991; PICHETH et al., 1994).

A determinação das seqüências de aminoácidos da BChE (LOCKRIDGE et al., 1987), com conseqüente conhecimento das seqüências de nucleotídeos de seu

cDNA (MCTIERNAN et al., 1987; PRODY et al., 1987) possibilitaram o seqüenciamento do gene *BCHE* (ARPAGAUS et al., 1990), o que tem permitido o estudo dos alelos ao nível de DNA.

O alelo atípico (*BCHE\*70G*) está presente na maioria das populações caucasóides, com freqüências em torno de 1% a 2%, mas é ausente ou muito raro em outras populações. Esse alelo é facilmente identificado por testes de inibição enzimática.

O fenótipo resistente ao fluoreto foi inicialmente identificado, pela sua maior sensibilidade à inibição por fluoreto de sódio (HARRIS; WHITTAKER, 1963) e, posteriormente, também foi identificado com o inibidor propranolol (WHITTAKER; BRITTEN; WICKS, 1981). Segundo SOUZA (2001) a freqüência conjunta ( $0,41 \pm 0,09\%$ ) dos alelos resistentes ao fluoreto F1 - *BCHE\*243M* ( $0,34\% \pm 0,08$ ) e F2 - *BCHE\*390V* ( $0,07 \pm 0,03$ ) varia bastante. Em populações caucasóides este valor é de cerca de 0,5%, enquanto que em certas populações africanas, provavelmente com alto grau de isolamento, ele pode alcançar valores de até 8% (revisão em WHITTAKER, 1986).

Estudos imunológicos sobre a variante K mostraram uma redução em torno de 33% no número de moléculas de BChE circulantes, que não apresentam propriedades catalíticas diferentes da enzima usual (GARRY et al., 1976).

A freqüência do alelo *BCHE\*K*, determinada pela análise direta do DNA, variou de cerca de 13% a 20%, em amostras de origem caucasóide, oriental e negróide (revisão em SOUZA et al., 1998). Por essa técnica detectam-se genótipos que não poderiam ser diferenciados através de testes de inibição.

A mutação J também pode ser identificada por teste de inibição enzimática, quando em heterozigose com a variante atípica (GARRY et al., 1976; EVANS et al., 1980; WHITTAKER; BRITTEN, 1987; WHITTAKER; BRITTEN, 1989). Quando comparada com a usual, a variante J apresenta uma diminuição de 2/3 no número de moléculas circulantes (GARRY et al., 1976). Essa mutação parece ser bastante rara e todos os indivíduos, estudados ao nível de DNA, eram membros de uma única família e apresentaram a mutação K, não sendo possível se determinar o efeito fenotípico isolado da mutação J (BARTELS; JAMES; LA DU, 1992).

Os alelos silenciosos são raros na maioria das populações estudadas. Atualmente o fenótipo silencioso é definido por atividades enzimáticas com níveis

mais baixos do que 10% dos níveis da enzima usual. Em revisão de WHITTAKER, 1986, a estimativa da frequência global, isto é, sem que se considere a heterogeneidade genética, está em torno de 0,3%. Altas frequências foram descritas em algumas populações: 11% em esquimós do Baixo Yukon e Alaska (GUTSCHE; SCOTT; WHRIGHT, 1967; SCOTT; POWERS, 1972) e em certas populações da Índia (GOPALAM; RAO, 1981); 2,1% em bascos (VERGNES; SEVIN; PERALTA, 1981) e 1% em certas populações francesas (ARNAUD et al., 1991). Trabalhos mais recentes (PESTEL; SPRENGER; ROTHHAMMER, 2003) mostram maiores frequências desses alelos do que as já descritas na literatura, devido aos avanços da genética molecular.

#### 2.2.3.2 Loco *CHE2*

A detecção de sua variabilidade é determinada por eletroforese. HARRIS et al. (1963) relataram que alguns soros após eletroforese exibiam bandas adicionais ( $C_5$ ) de baixa migração. Aos indivíduos que apresentaram essa banda ele denominou de CHE2  $C_5+$  e aqueles que não apresentaram a banda, CHE2  $C_5-$ . O genótipo usual, na presença do complexo  $C_5$  tem atividade cerca de 30% maior que o fenótipo CHE2  $C_5-$ . Estudos imunológicos determinaram que esses níveis de atividade mais altos são devidos a um maior número de moléculas circulantes e não a atividade específica maior (ALTLAND et al., 1971).

Várias técnicas foram desenvolvidas para melhorar a visualização da banda  $C_5$ . A identificação mais segura foi conseguida por VAN ROS; VERVOORT (1973), que adaptaram a técnica de ROBINSON et al. (1957), originalmente descrita para separar variantes de hemoglobina em gel de ágar ácido (pH 6,5). Com essa técnica, a banda  $C_5$  migra para o pólo positivo enquanto o conjunto das demais formas moleculares ( $C_{OF}$ ) migra em direção ao pólo negativo.

Vários estudos mostraram que o fenótipo CHE2  $C_5+$  apresenta atividade enzimática da BChE (ABChE) maior que o fenótipo CHE2  $C_5-$ . CHAUTARD-FREIRE-MAIA et al. (1991) demonstraram que a frequência de CHE2  $C_5+$  é maior em homens (12,3%) do que em mulheres (8,3%) e, que as pessoas com banda  $C_5$  forte apresentam em média cerca de 6 kg a menos que seus controles CHE2  $C_5-$ ,

pareados por idade, altura e sexo. Estes dados foram corroborados por ALCÂNTARA et al. (2001).

Existem evidências de que o loco *CHE2* codifica uma proteína diferente que interage com a subunidade produzida pelo loco *BCHE*, formando uma molécula híbrida entre BChE e essa proteína desconhecida. As propriedades do complexo C<sub>5</sub> causam mudanças na mobilidade da BChE e aumento na sua atividade específica (SOREQ et al., 1987; ARPAGAUSS et al., 1990).

OHKAWA; FURUYA; TABATA, (1988) demonstraram que a molécula desconhecida pode estar ligada a C<sub>4</sub> por um fosfolípido. MASSON (1991) considera que C<sub>5</sub> pode ser uma associação entre C<sub>4</sub> e uma substância de aproximadamente 60 kDa. A liberação de C<sub>4</sub> a partir do complexo C<sub>5</sub> foi observada, indicando uma associação não covalente entre C<sub>4</sub> e essa substância, embora o autor não tenha conseguido determinar qual a substância.

A frequência do alelo *CHE2*\*C5+ varia em diferentes populações (revisão em MOURANT; KOPÉC; DOMANIEWSKA-SOBCZAK, et al., 1976), estando sua média próxima de 5% na maioria das populações estudadas (revisão em WHITTAKER, 1986). Entretanto, para certas populações isoladas esses valores podem variar entre zero e 50,5% (revisão em ERBERICH et al., 1995).

#### 2.2.4 Outras Formas Moleculares da BChE

Além das bandas C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> e C<sub>4</sub>, presentes em todos os indivíduos, e da banda polimórfica C<sub>5</sub>, presente em cerca de 10% das populações caucasóides, outras bandas têm sido identificadas através de eletroforese.

SOUZA et al. (1993) ao introduzirem algumas alterações na técnica eletroforética em gel de ágar em pH ácido, visando posterior quantificação da banda C<sub>5</sub>, isolaram do conjunto C<sub>OF</sub>, outra banda, que denominaram provisoriamente de C<sub>4/5</sub>. Os melhores resultados foram obtidos com pH 5,3, no qual todas as amostras, tipadas como *CHE2* C5- (sem a banda C<sub>5</sub>), apresentaram uma banda, a qual corre também para o pólo positivo, mostrando expressividade variável. SOUZA (1995) mostrou também que essa banda está presente em todos os indivíduos de fenótipo *CHE2* C5+ examinados.

SOUZA (1995), em sua tese de mestrado, relata vários experimentos na tentativa de caracterizar a banda  $C_{4/5}$  e chega a algumas conclusões:  $C_{4/5}$  é determinada pelo loco *BCHE*, parece ser BChE ligada à outra substância por ligação não covalente, parece depender da interação da BChE com substância diferente daquela que forma  $C_5$ , parece ser monomórfica.

ALCÂNTARA et al. (2003a) verificaram que a intensidade desta banda está diretamente relacionada com o peso do indivíduo. Indivíduos com maior IMC apresentam maior intensidade deste complexo. Também observaram que esta banda sofre a influência da estocagem, assim, em soros estocados (4 a 6 meses) foram verificadas maiores intensidades destas bandas que em soros de coleta recente.

Técnicas modernas para separação de proteínas têm sido usadas para demonstrar a existência de formas múltiplas da BChE. A eletroforese, para investigação de formas múltiplas, tem sido usada desde 1960, entretanto o gel de poliacrilamida é o que tem dado melhores resultados na separação de bandas, obtendo boas resoluções. JUUL (1968) isolou 12 formas moleculares da BChE utilizando eletroforese de poliacrilamida.

Embora a detecção da colinesterase, por eletroforese, de plasma humano em amido usualmente forneçam 4 ou 5 bandas, o gel de poliacrilamida forma um gel mais endurecido e com poder de resolução melhor. Soros estocados a 4°C ou -20°C possuem bandas adicionais durante eletroforese, que são as chamadas bandas de estocagem. O aparecimento dessas bandas pode ser: devido à alteração da mobilidade eletroforética da colinesterase por clivagem dos resíduos de ácido siálico da estrutura da enzima, ou por clivagem da enzima por enzimas proteolíticas (BROWN et al., 1981).

Muitos trabalhos têm adotado a convenção internacional de nomenclatura que padroniza a numeração das isoenzimas consecutivamente, designando como 1 a que possui maior mobilidade em direção ao ânodo e assim por diante. Infelizmente em muitos casos, o método usado para demonstrar a existência de uma banda tem sido diferente do utilizado por outro pesquisador e, assim, usualmente não tem sido possível determinar quando uma “nova” banda já tenha sido nomeada anteriormente.

### 2.2.5 Alterações na Atividade da BChE

Os níveis da butirilcolinesterase no soro são influenciados por uma variedade de condições clínicas e estados fisiológicos (ROBERTSON, 1966).

BROWN et al. (1981), em revisão sobre os estudos que envolveram os níveis de colinesterases nas várias doenças humanas, dividiram os estudos em duas classes: uma delas, guiada pela esperança de associar os níveis de ABChE à doença (para revelar a função real da enzima) ou a natureza da doença; outra, relatando doenças que sugerem que a butirilcolinesterase seja um indicador sensível dos níveis de proteínas do plasma. Como a simples determinação da ABChE não pode revelar a redução de formação de proteínas no plasma por estar ligado também a fatores genéticos (variantes), esse teste não é difundido largamente (limitação pode ocorrer tanto na doença quanto na variação genética). Por causa destas limitações, o valor do teste só existe se for uma determinação seriada e por um determinado período do tempo, do contrário, fornece informações que não apresentam grau de certeza. Sendo a ABChE um traço firme na característica individual, tanto na constância quanto na especificidade, a determinação da sua atividade em determinados períodos de tempo, tem grande validade científica (HOSENFELD; SCHRÖTER, 1970).

Diminuições na ABChE têm sido descritas, na anemia severa (FABER, 1943), após o contato com compostos tóxicos como pesticidas organofosforados (THOMPSON; WHITTAKER, 1965; CARMONA et al., 2000; SUN et al., 2001), na deficiência renal (SIMON et al., 1969), com o uso de pílula anticoncepcional (WHITTAKER; CHARLIER; RAMASWAMY, 1971; REDDERSON, 1973), na gravidez (ROBERTSON, 1966; REDDERSON, 1973; SHNIDER, 1975), nas disfunções hepáticas, cujas condições interferem com a síntese de proteínas (hepatite aguda, cirrose aguda e metástase hepática e malnutrição), com alterações nos valores de proteínas totais (ARCHER; JANOWSKY, 1978; BROWN et al., 1981; HADA et al., 1988), no hipotireoidismo (THOMPSON, WHITTAKER, 1965; JOHNSON, 1997; POPOVIC et al., 1998), no uso de glicocorticóides (WEBER; BRANK; GRUBIE, 1999) e em estados febris (FABER, 1943).

Aumentos, em sua atividade, foram verificados na hipertensão e tireotoxicose (FABER, 1943), hiperlipidemias (KUTTY; PAYNE, 1994; ALCÂNTARA et al., 2002),



na obesidade (CHU et al., 1978; RANDELL; ROGERS; SMITH, 2001; ALCÂNTARA et al., 2003b), no Mal de Alzheimer (RANDELL; ROGERS; SMITH, 2001; SCHNEIDER, 2001; LEHMANN, et al., 2003) e no diabetes (RICCARDI, 1990; ALCÂNTARA et al., 2002), Aumentos da ABChE foram descritos em hipertireoidismo (THOMPSON; WHITTAKER, 1965), condição de maior mobilização de ácidos graxos livres e acelerada renovação de lipoproteínas no soro (CUCUIANU et al., 1975), situação semelhante a que ocorre com o uso do E<sub>2</sub> pela sua alteração nas frações lipídicas. Pode haver interação entre hormônios esteróides com tiroxina (ILLSLEY; LAMARTINIER, 1981) e tirosina (GEVORKIAN; SARKISIAN; PANOSIAN, 1982), estando bem estabelecido que aumentos de ABChE são obtidos experimentalmente por manipulação do sistema endócrino (KJELLSTRAND et al., 1985).

Maior ABChE tem sido observada no sexo masculino quando comparado ao feminino (SIDDEL; KAMINSKIS, 1975; LAMARTINIERE, 1986; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, 1989; MADDINENI; MIRAKHUR; MCCOY, 1994; ALCÂNTARA, 2000).

## 2.4 FUNÇÕES DA BChE

Embora até o momento não seja conhecida a função fisiológica específica da BChE, inúmeras funções têm sido a ela atribuídas. A BChE pode estar envolvida: com a regulação dos níveis de colina no plasma (CHU et al., 1978; ABBOTT et al., 1993), hidrolisando um largo número de substratos, como succinilcolina (BLITT et al., 1977; ARPAGAUS et al., 1990) e derivados de ácidos benzóicos e procaína (HAZEL; MONIER, 1971); com metabolismo de ácidos graxos no fígado e nas células reticuloendoteliais; e na remoção dos ésteres de colina formados durante ao metabolismo de ácidos graxos. Pode atuar como auxiliar da AChE no suporte e regulação da transmissão e regulação colinérgica (LI et al., 2000; MINIC et al., 2003) e estar associada à proliferação celular e crescimento dos neurônios durante o desenvolvimento do sistema nervoso (DARVESH; HOPKINS; GEULA, 2003). Pode, ainda, estar relacionada com função no metabolismo de lípidos e lipoproteínas (CHU et al., 1978; SHIRAI et al., 1985; ABBOTT et al., 1993), facilitando o transporte de

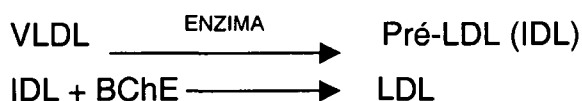
CT (colesterol total) da fração VLDL (lipoproteína de muito baixa densidade) ou IDL (lipoproteína de densidade intermediária) para LDL (lipoproteína de baixa densidade; SHIRAI et al., 1985); na metabolização de ésteres e fitotoxinas de plantas ingeridas na dieta (ABBOTT et al., 1993); e na metabolização de compostos tóxicos em humanos incluindo AAS (MASSON, 1998). CLITHEROW; MITCHARD; HARPER (1963) propuseram que a função da BChE seria hidrolisar os ésteres de acilcolina e talvez mais especificamente de butirilcolina, os quais possuem ação nicotínica indesejável no organismo e que podem ser produtos secundários do catabolismo dos ácidos graxos livres e da lipogênese no fígado.

É ainda utilizada como indicador de níveis normais/anormais de função hepática (BLITT et al., 1977; CAMMISA; ISOM; GREENE, 1988) e no tratamento profilático de prevenção de envenenamento por exposição a compostos contendo organofosforados na forma de agentes nervosos e pesticidas (SAXENA et al., 2002).

## 2.5 BChE E LÍPIDES

LAWRENCE; MELNICK (1961) sugeriram que parte da BChE poderia formar um complexo instável através de ligações físicas com a LDL. Quando no complexo, a BChE teria sua atividade diminuída. Essa hipótese foi apoiada por DUBBS (1966), quando conseguiu aumentar a atividade da BChE, após tratar o soro humano com ultra-som, que provavelmente desfez as ligações físicas com a LDL.

KUTTY; ROWDEN; COX (1973), além de tratarem a LDL com fosfolipase, que proporcionou liberação da BChE, levando-os a sugerir que a ligação entre LDL e BChE ocorresse na fosforilcolina da lecitina, também induziram hiperlipemia em coelhos após tratamento com lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*. Este último procedimento resultou num aumento de concentração de LDLs no soro e da atividade da BChE, levando-os a propor o seguinte esquema hipotético:



Evidências sugerem o envolvimento da BChE no metabolismo de lipídios e lipoproteínas (FABER, 1943; ABBOTT et al., 1993). Aumentos na ABChE têm sido correlacionados com aumentos nos níveis de triglicérides (TG; KUTTY; PAYNE, 1994; ALCÂNTARA et al., 2002), com diabetes mellitus (ABBOTT et al., 1993; RANDELL; ROGERS; SMITH, 2001; ALCÂNTARA et al., 2002) e obesidade (CHAUTARD-FREIRE-MAIA et al., 1991; ALCÂNTARA et al., 2003b).

A razão para o aumento de atividade da BChE nos obesos e diabéticos seria o aumento de lipogênese, resultando uma produção aumentada de CT e VLDL. Em pacientes diabéticos que apresentam hipertrigliceridemia, quando controlados com insulina, os TG e ABChE decresceram concomitantemente (KUTTY; PAYNE, 1994). Isso sugere a associação da BChE nos níveis de TG (triglicérides), possa estar relacionada ao aumento da atividade da enzima quando a secreção de insulina é inadequada ou ineficiente (ABBOTT et al., 1993).

ORESKOVIC; KUNEC-VAJIC (1992) e POPOVIC et al. (1998) sugeriram que a BChE poderia se originar não somente no fígado, mas também do tecido adiposo e que a síntese no tecido seria regulada por mecanismos diferentes daqueles do fígado. Essa hipótese foi reforçada quando RANDELL; ROGERS e SMITH (2001), estimularam a produção de BChE e TG utilizando células de adenocarcinoma intestinal humano (CACO 2). As respostas ao estímulo de produção com oleato, causaram aumentos na concentração de TG, mas não houve aumento na atividade da enzima; ao mesmo tempo, quando do uso de insulina, houve aumento na produção de BChE sem aumentar a produção de TG. Isso sugeriu que a produção de ácidos graxos e o aumento da atividade da BChE ocorrem por mecanismos independentes e sugere que a correlação entre aumento da síntese da enzima e hiperlipidemia não tem relação direta com a produção *in situ*.

Os valores de TG estão correlacionados com a LDL (CHU et al. 1978; KUTTY, PAYNE, 1994), com base na influência estabilizante da BChE sobre as lipoproteínas ou alternativamente como cofator na conversão da VLDL em IDL ou LDL (SHIRAI et al., 1985). O aumento da atividade da BChE na fração LDL, em pacientes com hiperlipemias, poderia ser devido à habilidade da  $\beta$ -lipoproteína de seqüestrar a BChE, ou pela associação da LDL e BChE nas interações de fosforilcolina do sítio da lecitina (CHU et al., 1978).

Relações da BChE com LDL e HDL (lipoproteína de alta densidade) foram relatadas no trabalho de NOUSIAINEN; RYHANEN (1984), ao verificarem a atividade da BChE e a concentração de CT e TG, em frações de lipoproteínas. Observaram que a atividade da BChE era relativamente alta no HDL-C. Após lavagem das frações, observaram que a concentração do CT mostrava-se aumentada nas frações LDL e HDL, enquanto a atividade da BChE aparecia aumentada no LDL e diminuída no HDL. Os resultados forneceram suporte para hipótese sugerida (KUTTY et al., 1981) de que o colesterol da HDL inibe a atividade da BChE, enquanto o colesterol da LDL estimula.

## 2.6 BChE E ESTRÓGENOS

Os estrógenos têm sido relacionados com o declínio da ABChE. Mulheres em idade fértil possuem níveis da atividade da enzima cerca de 64 a 74% do que os homens com a mesma idade, e após a menopausa, os níveis de atividade são semelhantes em ambos os sexos (SCOTT; POWERS, 1972; SIDDEL; KAMINSKIS, 1975).

Durante a gravidez, quando ocorre a produção aumentada de estrógenos pela placenta, foram descritos casos de diminuição da ABChE (SHNIDER, 1975; ROBERTSON, 1966; BLITT et al., 1977). Alguns autores relataram inclusive casos de apnéia prolongada durante a anestesia no momento do parto (SHNIDER, 1975; ROBERTSON, 1966). A redução da ABChE é mantida até o parto e seus níveis normais são alcançados após 6 semanas (ROBERTSON, 1966; HAZEL; MONIER, 1971; SHNIDER, 1975).

ROBERTSON (1967); WHITTAKER; CHARLIER; RAMASWAMY (1971); SIDDEL; KAMINSKIS (1975), associaram o uso de contraceptivo oral com a diminuição da ABChE. Situação oposta ocorre nas mulheres climatéricas, quando os níveis de estrógenos diminuem e há aumento da ABChE (LUINE; HARDING; BLEISCH, 1983; JOHNSON, 1997).

BLITT et al. (1977) demonstraram mudanças significativas na bioquímica da mulher grávida. Hemodiluição, alteração da função hepática, concentração

diminuída de albumina. Os efeitos dos estrógenos são os fatores implicados na redução da ABChE em gestantes. O fígado tem demonstrado ser o órgão alvo na ação dos estrógenos e alterações nos níveis de enzimas sintetizadas no fígado, em resposta à administração de estrogênio, têm sido relatadas. Diminuições nas concentrações de proteínas plasmáticas em mulheres usando contraceptivos orais contendo estrógenos têm sido relatadas (WHITTAKER; CHARLIER; RAMASWAMY, 1971) o que talvez possa explicar a relação negativa entre a ABChE e o uso de terapia de reposição hormonal (HRT).

Os estrógenos sintéticos usados para tratamento de carcinoma de próstata (ARCHER; JANOWSKI, 1978), assim como os das pílulas anticoncepcionais (ROBERTSON, 1967; SIDDEL; KAMINSKIS, 1975), são fatores significantes de queda da ABChE. ROBERTSON (1967) demonstrou que essa queda não era progressiva depois de 3 meses de uso de contraceptivo oral.

Três principais fatores têm sido responsabilizados por essa redução: inibição da enzima no plasma, redução da síntese hepática (WHITTAKER; CHARLIER; RAMASWAMY, 1971) e diminuição na liberação da enzima para a circulação (ROBERTSON, 1967; REDDERSON, 1973).

## 2.7 FASES DA MENOPAUSA

### 2.7.1 Definição

O termo menopausa é reconhecido universalmente e menopausa é definida classicamente como um processo biológico que representa a interrupção permanente da menstruação, pelo período de um ano consecutivo, resultado da perda da função ovariana. Ocorre, na maioria das vezes, de forma espontânea em idades que variam normalmente entre 42 e 58 anos, ou através de intervenções médicas (cirurgia, quimioterapia ou terapia de radiação).

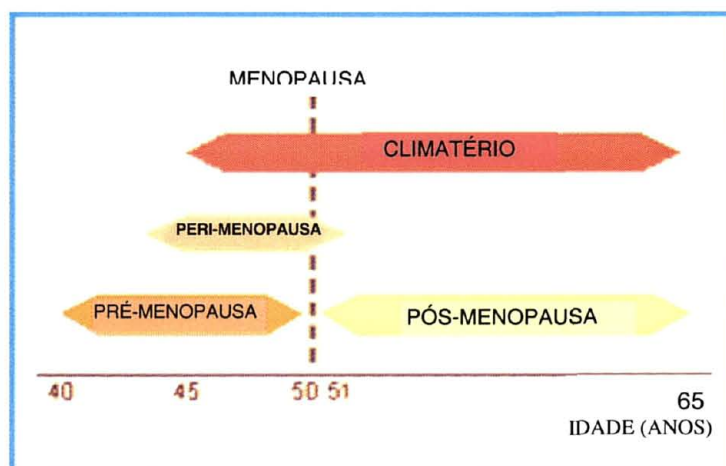
Segundo a NAMS (*The North American Menopause Society*, 2003) o resultado do STRAW (*Stages of Reproductive Aging Workshop*) realizado nos Estados Unidos da America (EUA) em 2001, e que contou com a participação de

diversos organismos internacionais que fazem parte da IMS (*International Menopause Society*), houve redefinição de alguns termos relacionados ao evento de idade reprodutiva da mulher.

### 2.7.2 Definições Cronológicas

Cronologicamente a idade não é um indicador acurado da idade reprodutiva. As definições clássicas são baseadas nas presenças dos ciclos menstruais, nos níveis hormonais e nos sintomas, divididos em: fases reprodutivas (pré-menopausa), estágio de transição da menopausa (ou peri-menopausa), menopausa e pós-menopausa, (representadas graficamente na FIGURA 2).

FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO DAS DEFINIÇÕES CRONOLÓGICAS DA MENOPAUSA



FONTE: Aging Workshop (STRAW), Menopause, 2001

#### 2.7.2.1 Fase reprodutiva

O ciclo menstrual envolve as fases: folicular, ovulatória e lútea. O início da fase folicular coincide com o início da menstruação. Os níveis de  $E_2$  e progesterona são baixos, sinalizando para o hipotálamo e glândula pituitária o estímulo para a produção de FSH (hormônio folículo estimulante). O FSH dá início ao processo de

maturação folicular. O folículo aumenta a produção de  $E_2$ , favorecendo o desenvolvimento do endométrio.

Na fase ovulatória, o Estradiol ( $E_2$ ) e LH (hormônio luteinizante) causam a liberação do óvulo. Os resíduos do folículo ovariano continuam a estimular o aumento do LH, transformando-se em corpo lúteo.

A fase lútea é marcada pelo aumento da produção de progesterona para enriquecer o endotélio na preparação da implantação do óvulo numa possível gravidez. Se a fertilização do óvulo não ocorre, o corpo lúteo regride,  $E_2$  e progesterona diminuem e a menstruação ocorre.

#### 2.7.2.2 Transição da menopausa

A transição da menopausa, anteriormente chamada de peri-menopausa, é a fase onde começam a ser sentidos os primeiros sintomas. É caracterizada pelo aumento nas concentrações de FSH; presença de ciclos menstruais irregulares, causados pelo declínio de folículos ovarianos e que culminam com o fim de episódios menstruais.

A mulher nasce com cerca de 1 a 2 milhões de folículos ovarianos, gerados ainda durante o desenvolvimento fetal. A maioria deles é perdida por atresia (degeneração da célula) e apenas em torno de 500 folículos participam da ovulação durante toda a vida. Na menopausa, apenas algumas poucas centenas permanecem. O aumento nos níveis de FSH após a idade de aproximadamente 37 (climatério) anos, contribui para acelerar a atresia folicular. A intensidade de atresia varia de mulher para mulher, o que gera as diferentes idades de menopausa.

Durante esse tempo é que começam a aparecer os distúrbios associados a fatores físicos (alterações hormonais) e a fatores psicológicos (como declínio da fertilidade, impacto da idade e estresses). As principais queixas e sintomas clínicos relatados (ACOG - *EDUCATIONAL BULLETIN*, 1998; NAMS, 2003) pelas mulheres nesse período incluem:

a) sintomas vasomotores:

a maioria das mulheres da Europa e América do Norte (75 a 85%) apresenta calorões, contrastando com 25% das mulheres do Japão. Não

há causa determinada. Há suposições de que a flutuação dos níveis de estrógenos possa ser responsável; outra hipótese é a diminuição da habilidade do estrogênio de se ligar a seus receptores. É o mais freqüente dos relatos no consultório médico. Atinge aproximadamente 85% das mulheres nesse período, com variados graus de intensidade. É caracterizado pela instabilidade vasomotora. São chamados de ondas de calor, calorões ou fogachos, pela sensação de aumento intenso de calor, especialmente na região do pescoço, rosto e mãos. A pele tinge-se de vermelho nessas regiões, devido o aumento de aporte sangüíneo. Essa sensação pode ou não ser acompanhada de sudorese de intensidade variável, especialmente no período noturno (JOHNSON, 1997; YUSUF; ANAND, 2002). O uso de estrogênio tem demonstrado diminuição na freqüência e intensidade desses episódios;

b) distúrbios do sono:

muitas mulheres (33 a 50%) nessa fase relatam problemas com o sono. A flutuação hormonal durante o declínio da atividade ovariana, ao mesmo tempo em que ocorrem alterações na vida dessas mulheres, com relação a trabalho, filhos, agravamento de doenças crônicas, ganho de peso e outros, podem ser as causas. Sono (em qualidade ou quantidade) inadequado favorece o aparecimento dos sintomas de letargia, inabilidade de concentração, fadiga, alterações na memória e irritabilidade. Tudo isso contribui para a ativação do estresse e depressão, que estão intimamente ligados;

c) depressão e ansiedade:

dados indicam que as mulheres são mais propensas a ansiedade que os homens, e que essas desordens normalmente estão relacionadas a eventos com grandes variações nos níveis hormonais, como: puberdade, período menstrual, pós-parto e menopausa (KALIBER et al., 1997). A maioria das mulheres passa pela transição da menopausa sem problemas psiquiátricos ou emocionais significantes;



d) problemas urogenitais:

descritos como atrofias urogenitais são comuns em 1/3 das mulheres. O decréscimo de estrogênio resulta em alterações do epitélio vaginal, caracterizado especialmente por perda da elasticidade e da capacidade de lubrificação do canal vaginal, com possibilidades de haver incontinência urinária e dor durante micção e relação sexual (IOSIF, 1992; JOHNSON, 1997);

e) problemas cognitivos:

dificuldade de concentração (capacidade de planejar e acuidade de memória) e capacidade de memorizar (aprendizado) menos eficiente, são relatos comuns da transição à pós-menopausa. Estrógenos, progesterona e andrógenos modulam a função cerebral, mesmo em regiões não ligadas a função reprodutiva. O cérebro possui receptores hormonais esteróides e alterações nos níveis de estrogênio afetam o sistema de neurotransmissão. A demência representa a perda da memória e de outras habilidades intelectuais, de forma a interferir substancialmente nas atividades usuais diárias. A mais comum causa de demência é o Mal de Alzheimer, doença de origem desconhecida, neurodegenerativa de progresso gradual. Há, aproximadamente, de 1,5 a 3 vezes mais mulheres do que homens com a doença. Há suspeitas de que a diminuição da concentração de estrogênio na menopausa aumente o risco da doença. Os estrógenos modulam a acetilcolina e outros neurotransmissores, protegendo contra certos tipos de danos neurais, protegendo contra o acúmulo da proteína  $\beta$ -amilóide, encontrada no Mal de Alzheimer (SCHNEIDER, 2001);

f) diminuição da libido:

a diminuição do desejo sexual, por alterações na produção de hormônios com a idade, é comum, em ambos os sexos, mas é particularmente maior na mulher depois dos 40 anos. Embora os estrógenos, no caso da mulher, sejam os principais responsáveis, a testosterona também é um importante fator, pois é ela que proporciona o desejo sexual, em ambos os sexos.

Durante a pós-menopausa, há também uma discreta diminuição nos níveis de testosterona. Um outro fator não hormonal, que reflete o estado psicológico da mulher, pode contribuir para a diminuição da libido (KAUNITZ, 1997);

g) alterações no sistema ósseo:

a osteoporose é a doença óssea que mais afeta os seres humanos. É caracterizada pela redução da massa óssea, acompanhada de deterioração de arquitetura. As mulheres são mais propensas a osteoporose em relação aos homens (MCKEON, 2002). Estudos têm demonstrado que a perda de estrogênio pode ser a chave para a osteoporose primária (é comumente encontrada no período de pós-menopausa; a osteoporose secundária é resultado de utilização de medicamentos como glicocorticóides, ou resultado de doenças, como doença celíaca). O declínio dos níveis de  $E_2$  é o fator predominante no aumento da perda óssea associada à menopausa (ACOG - *EDUCATIONAL BULLETIN*, 1998; NAMS, 2003);

h) alterações no sistema cardiovascular:

doenças cardiovasculares em mulheres são incomuns antes da menopausa. Após esse período, os riscos aumentam. Quando examinadas as possíveis razões para o aumento de doença cardiovascular (DAC) na mulher pós-menopausada, encontram-se principalmente as elevações nos níveis de, LDL-C (MARTINEZ et al., 1997); CT (CARR; GRIFFIN, 1998), TG (MARTINEZ, 1997), sendo que a fração do HDL-C permanece relativamente constante (SALGADO FILHO; MARTINEZ; ALDRIGHI, 2003). Apesar das razões para aumento de DAC em mulheres após os 55 anos de idade serem multifatoriais, a incidência da doença com relação ao sexo sugere que hormônios sexuais endógenos ( $E_2$  e progesterona) e andrógenos possuam importante papel na aterogênese (SALGADO FILHO; MARTINEZ; ALDRIGHI, 2003). A HRT com estrógenos mostrou redução de 50% nos eventos coronarianos. Há estudos que demonstram que o uso de estrogênio produz benefícios na prevenção de DAC por modificações

benéficas que ocorrem no perfil lipídico, incluindo elevações nos níveis de HDL-C e o decréscimo de CT e LDL-C (MARTINEZ, 1997). Atualmente, não é mais justificada a prescrição de HRT para prevenção de DAC após a divulgação de dados do WHI (*Woman's Health Initiative*), que não confirmaram seu efeito protetor (FEBRASGO, 2002; YUSUF; ANAND, 2002; SALGADO FILHO; MARTINEZ; ALDRIGHI, 2003);

i) ganho de peso:

durante a transição da menopausa muitas mulheres ganham peso, em média um acréscimo de 2,5 kg. O aumento, algumas vezes atribuído à menopausa e/ou a Terapia de Reposição Hormonal (HRT), não tem apoio científico. Aparentemente está mais relacionado à idade, estilo de vida e, como sugerem algumas pesquisas, à troca de distribuição da gordura, que, nessa fase, tende a concentrar-se na região abdominal.

### 2.7.2.3 Menopausa

O termo Menopausa refere-se ao período da vida da mulher em que os episódios menstruais não ocorrem por 12 meses consecutivos.

### 2.7.2.4 Pós-menopausa

Pós-menopausa é o período de tempo após a menopausa (12 meses consecutivos sem episódios menstruais), independente de ter ocorrido por processo espontâneo ou induzido. A duração desse período é variável, porque acompanha a expectativa de vida de cada mulher.

O climatério compreende grande parte da peri-menopausa, menopausa e pós-menopausa. Visando facilitar o entendimento do presente trabalho, uma vez que participaram das pesquisas mulheres em diferentes fases do ciclo reprodutivo da mulher (peri-menopausa, menopausa e pós-menopausa), os termos CLIMATÉRIO e CLIMATÉRICAS serão utilizados para as mulheres que se encontram em qualquer um desses estágios, de acordo com a FIGURA 2.

### 2.7.3 Alterações Hormonais nas Diferentes Fases

Testes de função ovariana (FSH, E<sub>2</sub>, LH e progesterona) podem ser importantes para diferenciar as várias causas de amenorréia, como o climatério, além de também detectarem falência prematura de ovário, amenorréia hipotalâmica e ciclo ovulatório.

#### 2.7.3.1 Hormônio folículo estimulante (FSH)

É geralmente aceito que a mulher no climatério tem valores consistentemente elevados de FSH (NAMS, 2003) acima de 30 mUI/mL (valores de referência segundo TABELA 2)

A dificuldade em usar FSH como marcador preciso na fase de transição, é que os valores de FSH podem estar dentro dos níveis normais, ou altos por períodos longos antes do FPM (final de períodos menstruais).

#### 2.7.3.2 Estradiol (E<sub>2</sub>)

Níveis de E<sub>2</sub> (TABELA 3) são praticamente zerados durante o climatério, permanecendo indetectáveis até o fim da pós-menopausa (NAMS, 2003). A essa queda é que estão associadas às sintomatologias do climatério.

TABELA 2 - VALORES DE REFERÊNCIA DO FSH

Períodos	Valores em mUI/mL		
Pico Ovulatório	6,0	a	24,0
Fase Folicular	2,9	a	12,0
Fase Lútea	1,5	a	7,0
Pós-menopausa	17,0	a	95,0

FONTE: *New England Journal of Medicine SI- United Conversion Guide*

TABELA 3 - VALORES DE REFERÊNCIA DO E<sub>2</sub>

Período	Valores mUI/mL
Fase Folicular	18,0 a 147,0
Pico Ovulatório	93,0 a 573,0
Fase Lútea	43,0 a 214,0
Menopausa	Abaixo de 58,0

FONTE: *New England Journal of Medicine SI- United Conversion Guide*

### 2.7.3.3 Hormônio luteinizante (LH) e progesterona

Embora sejam marcadores de função ovariana, têm valor limitado para diagnóstico de climatério quando usados isoladamente. As alterações nos valores de LH associados ao climatério ocorrem mais tarde do que o aumento de FSH, sendo geralmente significativos apenas na pós-menopausa (NAMS, 2003).

A progesterona é relativamente normal antes do climatério, só alterando com o avanço da idade.

Os valores de LH e progesterona nas diferentes fases do ciclo menstrual e menopausa encontram-se nas TABELAS 4 e 5, respectivamente.

### 2.7.3.4 Testosterona

O nível de testosterona contribui muito pouco para o diagnóstico de climatério, tendo apenas um discreto declínio. Somente em mulheres que realizam ooforectomia os valores são baixos (KAUNITZ, 1997). Valores de referência encontram-se na TABELA 6.

TABELA 4 - VALORES DE REFERÊNCIA DO LH

Período	Valores mUI/mL
Pico Ovulatório	9,6 a 80,0
Fase Folicular	1,5 a 8,0
Fase Lútea	0,2 a 6,5
Menopausa	8,0 a 33,0

FONTE: *New England Journal of Medicine SI- United Conversion Guide*

TABELA 5 – VALORES DE REFERÊNCIA DA PROGESTERONA

Período	Valores ng/mL
Menopausa	Até 1,0

FONTE: *New England Journal of Medicine SI- United Conversion Guide*

TABELA 6 - VALORES DE REFERÊNCIA DA TESTOSTERONA

Período	Valores ng/dL
Menopausa	49 a 113

FONTE: *New England Journal of Medicine SI- United Conversion Guide.*

## 2.8 TERAPIA DE REPOSIÇÃO HORMONAL

O termo Terapia de Reposição Hormonal (HRT) é utilizado para distinguir a terapia de reposição referente ao climatério, de outras terapias hormonais (uso de contraceptivos).

A primeira grande campanha de “marketing” que abordou o uso de HRT foi feita pelo ginecologista Robert Wilson, M.D. no livro *Femini Forever*, 1966, financiado pela Ayerst Laboratories, para divulgar o Premarin®. O Premarin®, produto estrogênico que havia sido extraído de urinas de éguas prenhas por Willard Allen e que estava sendo comercializado pela Ayerst, deu origem a uma campanha de propaganda maciça. Nesse livro, o climatério era abordado como uma doença que fazia com que a mulher perdesse sua feminilidade e que essa “doença” poderia ser

tratada. O livro vendeu mais de 100 milhões de cópias em 7 meses e em 1975 aproximadamente 6 milhões de mulheres usavam Premarin® nos Estados Unidos (LORENTZEN, 2002).

Embora o Premarin® continue sendo utilizado, diversas preparações hormonais têm sido utilizadas desde a década de 70 para prevenir os danos da idade. Alguns pequenos efeitos adversos são conhecidos e têm sido tolerados em função dos benefícios serem maiores que as inconveniências (YUSUF; ANAND, 2002).

A indicação de uso de HRT acontece quando sintomas relativos ao hipoestrogenismo são severos o bastante para afetar a qualidade de vida da mulher e justificar o uso de hormônios (ACOG - *EDUCATIONAL BULLETIN*, 1998; YUSUF; ANAND, 2002).

O estudo clínico da *Women's Health Initiative* (WHI), iniciado em 1993 e patrocinado pelo *National Institutes of Health* (NIH) nos Estados Unidos, tinha o objetivo de fazer o balanço entre riscos e benefícios das terapias prolongadas de HRT. O estudo incluía mais de 27.000 mulheres pós-menopausadas, em estudo duplo cego, comparativo e controlado com grupo placebo. O objetivo era avaliar os efeitos do uso de estrogênio sobre o risco de infarto do miocárdio e câncer de mama. Foi utilizado regime combinado contínuo por via oral de estrogênio eqüino conjugado (CEE) e acetato de medroxiprogesterona (MPA) nas doses respectivas de 0,625 e 2,5 mg/dia. Alguns objetivos secundários também foram considerados: acidente vascular cerebral (AVC), embolia pulmonar, câncer colo-retal e fratura de bacia (FEBRASGO, 2002).

Os resultados esperados para serem divulgados com 8,5 a 10 anos de pesquisa, foram interrompidos em 31 de maio de 2002 após 5,2 anos, devido à incidência de câncer invasivo de mama ter ultrapassado os limites de segurança estabelecidos pelo DSMB (*Date and Safety Monitoring Board*). O WHI mostrou haver aumento do risco de câncer de mama, acidente vascular cerebral e tromboembolismo venoso. De outra parte, mostrou (TABELA 7) que ocorreu diminuição do risco de fraturas do quadril e de câncer colo-retal (FEBRASGO, 2002; YUSUF; ANAND, 2002;). Foram avaliados os efeitos de um único regime terapêutico (estroprogestivo combinado contínuo), através de uma única via de administração (oral), com uma única dose de hormônios (considerada plena ou convencional).

Outro grupo de mulheres, em estudo pelo WHI, que estão usando apenas estrogênio não foi interrompido.

Esses dados, embora inquestionáveis, devem, no entanto, ser restritos ao regime de tratamento empregado por essas pacientes. É interessante relatar que os resultados desta pesquisa, embora não sejam, particularmente, surpresas, uma vez que já haviam sido relatados riscos de câncer de mama com uso prolongado de CEE (ACOG - *EDUCATIONAL BULLETIN*, 1998), colocaram em dúvida a utilização desse tipo de formulação e da utilização de terapias prolongadas.

Desde a divulgação da pesquisa, alguns clínicos passaram a reconsiderar o uso de HRT, baseando-se nos fatos de que os riscos possam não justificar os benefícios. Isso pode encorajar a formulação e uso de hormônios bio-sintéticos e mantém a perspectiva de uso de HRT por períodos de tempo não prolongados, esperando minimizar os efeitos adversos.

O que o WHI não pode contabilizar, foram os benefícios que as mulheres que apresentavam sintomas severos obtiveram na qualidade de vida. A HRT necessita de estudo e conduta criteriosa do clínico, pois a decisão de iniciar a HRT deve sempre levar em conta a peculiaridade de cada paciente, procurando individualizar o regime terapêutico adotado, as doses, vias a serem empregadas e o tempo de utilização, considerando os benefícios e os riscos dessa modalidade de tratamento.

A HRT pode abranger o uso de estrogênio para pacientes histerectomizadas, ou estrogênio mais progesterona. Embora pesquisas demonstrem apenas benefícios do estrogênio na redução dos sintomas, a progesterona reduz o risco de câncer endometrial nas mulheres que não foram submetidas a histerectomia.

O uso de HRT relata melhoras de todos os sintomas relacionados ao hipoestrogenismo: melhora do aspecto da pele e cabelo (ACTA MÉDICA PORTUGUESA, 1997; VANKRIEKEN; LUTHART, 2002; YUSUF; ANAND, 2002); melhora dos sintomas vasomotores, com redução da intensidade e frequência das ondas de calor (IOSIF, 1992; KAUNITZ, 1997; BARACAT et al., 1999; HAN et al., 2002); melhoras urogenitais (IOSIF, 1992; ACTA MEDICA PORTUGUESA, 1997); prevenção à osteoporose (KAUNITZ, 1997; BARACAT et al., 1999; PALACIOS, 2001); melhora da memória (DANIEL; DOHANICH, 2001; STEVENSON; MALCOM, 2002); proteção cardiovascular (LUCA; LUCA; CRISTIUMA, 1996; ACTA MEDICA



PORTUGUESA, 1997; KAUNITZ, 1997; HAN et al., 2002); melhora da libido (ACTA MEDICA PORTUGUESA, 1997; KAUNITZ, 1997).

**TABELA 7 – RISCO RELATIVO DOS DIFERENTES EVENTOS CLÍNICOS APRESENTADOS PELO ESTUDO WHI NO GRUPO DE MULHERES PÓS-MENOPAUSADAS, NÃO HISTERECTOMIZADAS SUBMETIDAS A HRT ESTRO-PROGESTATIVA COMBINADA CONTÍNUA**

Eventos clínicos Risco Aumentado	Risco relativo	Intervalo confiança 95%	Risco Absoluto 10.000mulheres/ano
Ataques cardíacos	1,29	1,02 - 1,63	7
Acidente Vascular Cerebral	1,41	1,07 - 1,85	8
Câncer de Mama	1,26	1,00 - 1,59	8
Tromboembolismo Venoso	2.11	1,58 - 2,82	8
Eventos Clínicos Risco Diminuído	Risco relativo	Intervalo de Confiança 95%	Risco Absoluto 10.000 mulheres/ano
Câncer de cólon e reto	0,63	0,43 - 0,92	6
Fraturas de bacia	0,66	0,45 - 0,98	5

FONTE: FEBRASGO, 2002

## 2.9 OPÇÕES TERAPÊUTICAS PARA HRT

Classificação segundo a NAMS, 2001.

### 2.9.1 Estrógenos

O termo estrógenos refere-se a um grupo de hormônios que possuem funções similares. No ser humano, o estradiol ( $E_2$ ) é o primeiro e mais potente estrógeno secretado pelo ovário, predominando antes da menopausa. A estrona ( $E_1$ ) é o segundo mais abundante e é derivada principalmente por oxidação do  $E_2$ , podendo ainda ser formada a partir da aromatização da androstenediona no tecido gorduroso, embora ovário e adrenal secretem pequenas quantidades e é o estrógeno produzido depois da menopausa. O estriol ( $E_3$ ) é produzido primeiramente por hidratação da  $E_1$ . Os estrógenos não promovem aumento de endométrio.

Há uma variedade química de compostos naturais (plantas, animais ou compostos de estrutura química igual ao estrogênio humano) e sintéticos, com afinidade pelos receptores de estrogênio:

- a) estrógenos humanos:  $E_1$ , 17  $\beta$ -estradiol,  $E_2$  e  $E_3$ . O  $E_2$  é o principal estrógeno secretado pelo ovário e o mais biologicamente ativo. É metabolizado a  $E_1$  e ambos,  $E_2$  e  $E_1$ , podem ser convertidos em  $E_3$ ;
- b) estrógenos não humanos: estrogênios eqüinos conjugados (Premarin®) são misturas de estrógenos extraídos das urinas de éguas prenhas. Contém sais sódicos dos ésteres sulfatados hidrossolúveis de  $E_1$ , equilina e 17- $\alpha$ -diidroequilina, bem como quantidades menores de 17- $\alpha$ -  $E_2$  e outros componentes;
- c) misturas de estrógenos sintéticos: são conjugados sintéticos de estrógenos ou estrógenos esterificados;
- d) fitohormônios ou fitoestrógenos: são substâncias não esteroidais derivadas de plantas (soja, alfafa, linhaça, trevo vermelho e fungos), que apresentam estrutura e atividade biológica semelhante aos estrógenos. Podem ocorrer em diversas formas moleculares: Malonil derivados,  $\beta$ -glicosídeos, acetil-derivados e agliconas. No Brasil só existe registrado na ANVISA (Associação Nacional de Vigilância Sanitária) como medicamentos fitoterápicos a Isoflavona, com propriedades reconhecidas para alívio das ondas de calor e como auxiliares na redução do CT;
- e) Tibolona: é um composto esteróide estruturalmente relacionado aos derivados da 19-nortestosterona (tais como noretisterona), o qual exibe concomitantemente fraca atividade estrogênica, progestogênica e androgênica (PALACIOS, 2001). É um grupo biologicamente ativo que durante sua metabolização se converte nos composto  $\Delta^4$ - Tibolona, 3 $\beta$ -OH Tibolona e 3 $\alpha$ -OH Tibolona. Esses compostos se ligam a diferentes

receptores esteróides nas células, gerando efeitos estrogênicos quando mimetizam o estrogênio e antiestrogênicos quando interferem no processo metabólico, dependendo do tecido alvo (FDA, 1999; HAN et al., 2002). Dados clínicos indicam que a Tibolona produz efeitos necessários para tratar o climatério em períodos prolongados sem estimular o crescimento de tecidos do endométrio e mama;

- f) Raloxifeno (Evista®): é uma classe de compostos que age como mimetizador do estrogênio, antagonista do estrogênio, ou indiretamente alterar a atividade do hormônio. São compostos chamados de ruptores endócrinos. Liga-se aos receptores de estrogênios nos tecidos e induzem a ação de muitos componentes com atividade de estrógenos ou andrógenos. Possuem mecanismos ainda pouco estudados e bastante complicados. Um dos mecanismos pode ser a inibição da enzima aromatase, que converte andrógenos em estrógenos, resultando no decréscimo dos níveis de estrógenos ou aumento nos níveis de andrógenos nas células (YANG; CHEN, 1999). Pesquisas indicam que aumentam a densidade óssea em mulheres climatéricas, não com a mesma eficiência que o E<sub>2</sub>, mas em contrapartida, não estimulam o crescimento de tecidos de útero e mamas, com risco potencialmente menor para desenvolver câncer. Seu uso tem sido recomendado para mulheres que não podem fazer uso da HTR convencional ou outras drogas preventivas;
- g) progesterona: é um composto produzido pelo ovário depois da ovulação e pela placenta durante a gravidez. A farmacocinética da progesterona, usada em HRT, é pobremente caracterizada. É descrita para uso em mulheres que possuem útero, com intenção de reduzir riscos de hiperplasia de endométrio provocados pelo uso do E<sub>2</sub> e que estão relacionados ao aumento na incidência de câncer. É disponível comercialmente como progesterona, sintetizada em laboratório e com estrutura idêntica à humana; progestina, produto sintético que tem

progesterona ativa mas com estrutura não idêntica à humana, obtida a partir de derivado de planta (inhame bravo ou soja).

## 2.10 FORMULAÇÕES

Várias formulações estão disponíveis comercialmente no mercado mundial. (ACOG - *EDUCATIONAL BULLETIN*, 1998; FEBRASGO, 2002; *THE MERCK MANUAL OF DIAGNOSIS AND THERAPY*, 2002; NAMS, 2003). As mais utilizadas são:

### 2.10.1 Formulações Orais

Nas formulações com estrógenos administrados por via oral, em formato de comprimidos, a  $E_1$  será o estrógeno predominante na circulação, depois de sua primeira passagem pelo fígado. O efeito hepático é associado com aumento de 25% nos níveis de TG e HDL-C. É de fácil uso, com o desconforto de ter que ser ingerido diariamente, no entanto sua distribuição não ocorre de maneira natural.

### 2.10.2 Formulações Transdérmicas

São emplastos, contendo  $E_2$ , que são colocados em adesivos colados à pele. Podem ser usados em baixas concentrações de hormônio porque não dependem de absorção gastrointestinal. Têm a vantagem teórica de manter os níveis de estrógenos constantes no sangue. Não alteram os níveis de HDL-C e TG. Podem causar irritação no local de aplicação e tem custo maior que as formulações orais.

### 2.10.3 Formulações Tópicas

São produtos formulados especialmente para uso vaginal: cremes ou óvulos. São mais efetivos no tratamento de vaginites atróficas e não tem uso indicado para obtenção de efeitos sistêmicos, como combate a ondas de calor e osteoporose.

## 2.11 REGIMES TERAPÊUTICOS

Há diferentes regimes de HRT e não existe consenso no regime de preferência. Podem ser classificados em:

### 2.11.1 HRT Cíclico

O estrogênio é tomado do 1° ao 25° dia com adição de progesterona a partir do 10° ou 14° dia. É permitida de 3 a 6 dias de intervalo livres do hormônio. A progesterona pode ser usada por 10 dias ou mais. Imita o ciclo ovulatório normal. Com esse regime, 80% das mulheres tem sangramentos uterinos 1 a 2 dias depois da última dose de progesterona e continua por poucos dias. É a mais antiga das formas de HRT utilizada, sendo seu uso, atualmente, substituído por terapias que produzam pouco ou nenhum sangramento uterino.

### 2.11.2 HRT Ciclo Combinada

O estrogênio é combinado com progesterona do 1° ao 25° dia, seguidos de 5 dias de intervalo livres de hormônio. Este regime resulta em baixas quantidades de sangramentos e tem alta tolerabilidade. Sangramentos uterinos ocorrem nos primeiros ciclos e decrescem com o tempo.

### 2.11.3 HRT Ciclo Contínua ou Seqüencial

O estrogênio é usado por 14 dias. A partir do 10° ou 14° dia é adicionado o progestinogênio por mais 14 dias. Sangramentos ocorrem em aproximadamente 80% das mulheres. Não há pausa. A vantagem sobre a HRT cíclica é que não há

dias livres de hormônios, período durante o qual alguns sintomas vasomotores podem aparecer.

#### 2.11.4 HRT Ciclo Longo Contínua

O estrogênio é utilizado diariamente e os ciclos de uso de progesterona durante 14 dias, só acontecem a cada 3 ou 6 meses. Esse regime reduz a incidência de sangramentos por períodos mais longos, no entanto os efeitos de proteção endometrial são indeterminados.

#### 2.11.5 HRT Contínua Combinada

Nesse regime, as mulheres usam progesterona e estrogênio todos os dias. Depois de alguns meses o endométrio atrofia, resultando em amenorréia. Não há estudos suficientes sobre a incidência de câncer endometrial associada a esse regime. É o regime de preferência em alguns países como os EUA (Estados Unidos da América).

#### 2.11.6 HRT Pulso Contínua ou Intermitente

Nesse regime, são usadas doses diárias de estrogênio enquanto a progesterona é administrada em ciclos intermitentes de 3 em 3 dias, repetidamente sem interrupções. Isto resulta em 80% de mulheres com amenorréia após 1 ano de uso, enquanto parece haver proteção ao endométrio.

### 2.12 FORMULAÇÕES COMERCIAIS DISPONÍVEIS NO BRASIL

As principais formulações encontradas no Brasil estão descritas nas TABELAS de números 8 a 13.

TABELA 8 - COMPRIMIDOS DE ESTRÓGENOS

Comprimidos utilizados por mulheres submetidas a histerectomia.	
Merimono ( <i>Novartis</i> )	Valerato de estradiol 1 mg
Menotensil ( <i>Sintofarma</i> )	Estrógenos eqüinos conjugados 0,625 mg
Ovestrion ( <i>Organon</i> )	Estriol 1,0 mg ou 2,0 mg
Premarin ( <i>Wyeth</i> )	Estrógenos conjugados 0,625 mg; 0,3 mg; 1,25 mg ou 2,5 mg
Repogen ( <i>Libbs</i> )	Estrógenos conjugados 0,625 mg

TABELA 9 - COMBINAÇÕES ESTRÓGENO/OUTRAS SUBSTÂNCIAS

Combinam estrógeno/progesterona em drágeas	
Akteville ( <i>Medley</i> )	Estradiol 1mg + norestisterona 0,5 mg
Cicloprimogyna ( <i>Schering</i> )	Valerato de estradiol 2 mg e Valerato de estradiol 2 mg + levonorgestrel 0,25 mg
Cliane ( <i>Schering do Brasil</i> )	Estradiol 2 mg + acetato de norestisterona 1 mg
Climene ( <i>Schering</i> )	Valerato de estradiol 2,0 mg e Valerato de estradiol 2,0 mg + ciproterona 1 mg
Dilena ( <i>Organon</i> )	Valerato de estradiol 2 mg e Valerato de estradiol 2 mg + acetato de medroxiprogesterona 10 mg
Mericomb ( <i>Novartis</i> )	Valerato de estradiol 1 mg e Valerato de estradiol 1,0 mg + acetato noretisterona 1,0 mg
Merigest ( <i>Novartis</i> )	Valerato de estradiol 2,0 mg + acetato de norestisterona 0,7 mg
Prefest ( <i>Janssen-Cilag</i> )	Estradiol 1 mg e Estradiol 1 mg + norgestimato 90 mcg
Premelle Ciclo ( <i>Weith</i> )	Estrógenos conjugados 0,625 mg e Estrógenos conjugados 0,625 mg + acetato de medroxiprogesterona 2,5 mg
Postoval ( <i>Wyeth</i> )	Valrato de estradiol 2,0 mg e Valerato de estradiol 2,0 mg + levonorgestrel 0,25 mg
Repogen Conti ( <i>Libbs</i> )	Estrógenos conjugados 0,625 mg + acetato de medroxiprogesterona 2,5 mg
Trisequens 2 mg ( <i>Medley</i> )	Estradiol 2 mg e Estradiol 2 mg + acetato de norestisterona 1 mg Estradiol 1 mg

TABELA 10 - EMLASTROS DE ESTRÓGENOS

Emplastro/gel para pele contendo apenas estrógenos	
Estraderm TTS ( <i>Novartis</i> )	Estradiol 2 mg; 4 mg ou 8 mg
Estreva gel ( <i>Merck</i> )	17 $\beta$ -estraidiol 0,5 mg
Ginedisc ( <i>Schering do Brasil</i> )	Estradiol 2 mg; 4 mg ou 8 mg
Lindisc 50 ( <i>Schering do Brasil</i> )	Estradiol 3,9 mg
Sandrena gel ( <i>Akzo Nobel</i> )	Hemi-hidrato de estradiol 0,5 g ou 1 g
System 25/50/100 ( <i>Janssen-Cilag</i> )	Estradiol 1,6 mg; 3,2 mg ou 6,4 mg

TABELA 11 - EMLASTROS DE ESTRÓGENOS E PROGESTERONA COMBINADOS

Emplastos para pele contendo estrógenos/progestógenos	
Estalis ( <i>Novartis</i> )	Hemi-hidrato de estradiol 4 mg e Hemi-hidrato de estradiol 4 mg + acetato de noretisterona 30 mg
Estragest TTS ( <i>Solvay</i> )	Estradiol 5 mg + acetato de noretisterona 1 mg
Ginedisc 50 ( <i>Schering</i> )	Estradiol 4 mg e Estradiol 10 mg + acetato de noretisterona 30 mg
Lindisc Duo ( <i>Schering</i> )	Estradiol 3 mg e Estradiol 2,5 mg + levonorgestrel 1,0 mg
Estracomb TTS ( <i>Novartis</i> )	Estradiol 4 mg e Estradiol 10 mg + acetato de noretisterona 30 mg
System Sequi ( <i>Janssen-Cilag</i> )	Estradiol 3,2 mg e Estradiol 3,2 mg + acetato de noretisterona 11,2 mg
System Conti ( <i>Janssen-Cilag</i> )	Estradiol 3,2 mg+ acetato de noretisterona 11,2 mg

TABELA 12 - ESTRÓGENOS EM CREMES VAGINAIS

Estrógenos locais que combatem o ressecamento e atrofia vaginal.	
Ovestrion ( <i>Organon</i> )	Estriol 1 ou 2 mg
Premarin Creme ( <i>Wyeth</i> )	Estrógenos conjugados 0,625 mg/g



TABELA 13 – FORMULAÇÕES NÃO HORMONAIS PARA USO DE HRT

Isoflavona ( <i>Iso soy</i> )	
Libian ( <i>Libbs</i> )	Tibolona 2,5 mg
Livial ( <i>Akzo Organon</i> )	Tibolona 2,5 mg

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem por objetivo verificar a influência da terapia de reposição hormonal nas atividades da butirilcolinesterase (BChE), algumas variáveis bioquímico-hormonais e IMC em mulheres climatéricas. Este termo, como citado anteriormente, compreende os períodos de peri-menopausa, menopausa e pós-menopausa (FIGURA 2), e será utilizado devido às mulheres analisadas, no presente estudo, encontrarem-se em um destes períodos .

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar as atividades da BChE (total e das diferentes formas moleculares), em mulheres climatéricas, não submetidas a HRT.
- Verificar as atividades da BChE, nessas mesmas mulheres, 2 a 8 meses após o início da HRT.
- Comparar as atividades (total e das diferentes formas moleculares da BChE) em mulheres climatéricas, antes e após HRT.
- Observar a relação entre as atividades da BChE (total e das diferentes formas moleculares) com o IMC e as variáveis bioquímico-hormonais antes e após HRT.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL

Foi coletado sangue de 60 mulheres climatéricas, euro-brasileiras, com idade média de 52,4 anos (variando de 38 a 72 anos), que não haviam sido submetidas à HRT. As pacientes dirigiram-se ao Bio Vitae Laboratório de Análises Clínicas, localizado à rua Uruguai, 227 D, na cidade de Chapecó, SC, encaminhadas por ginecologistas e/ou endocrinologistas, após terem sido avaliadas clinicamente e orientadas sobre o tipo de HRT a que seriam submetidas. No Laboratório, foram instruídas sobre sua participação na pesquisa e assinaram Termo de Consentimento Livre e Informado (Anexo 1). O termo encontra-se de acordo com as normas do Comitê de Ética para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Hospital de Clínicas/UFPR, ao qual esse projeto foi submetido e aprovado sob protocolo CEP-HC Número 056ext010/2002-06 (Anexo 2).

Os sangues dessas pacientes foram coletados em duas etapas distintas: a primeira antes do início da HRT e a segunda, de 2 a 8 meses de uso do hormônio prescrito pelo clínico da paciente.

#### 4.1.1 Primeira Coleta

O sangue de cada paciente foi coletado após 12 horas de jejum, antes do início da HRT. A amostra de sangue foi coletada pelo sistema Vacuntainer, ou com utilização de seringa e agulha descartáveis, e acondicionada em 4 diferentes tubos de coleta: 1 tubo sem anticoagulante; 1 tubo contendo anticoagulante EDTA; 1 tubo contendo anticoagulante citrato e 1 tubo contendo anticoagulante fluoreto. Depois de realizada a coleta, respeitando-se o tempo para separação do soro no tubo que não contém anticoagulante, os três tubos de ensaios (com fluoreto, citrato e sem anticoagulante) foram centrifugados a 1.500 rpm até completa separação de plasma ou soro. Após a centrifugação, os plasmas e os soros obtidos foram devidamente separados em tubos limpos, identificados com etiquetas contendo o tipo de material (soro; plasma/citrato; plasma/fluoreto), nome e número do paciente. Uma parte dos soros obtidos foi mantida em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento da realização do

exame. O material colhido com EDTA foi mantido no próprio tubo, recebendo etiqueta de identificação com número e nome do paciente. O número do paciente foi fornecido através de entrada no sistema de computação do Laboratório (Labplus – Hot Soft Informática).

Dessas pacientes, além da idade as seguintes variáveis foram analisadas: IMC (índice de massa corporal), CT (colesterol total), HDL-C (colesterol da lipoproteína de alta densidade), LDL-C (colesterol da lipoproteína de baixa densidade), TG (triglicérides), GLC (glicose), uréia, CREA (creatinina), GGT (gama-glutamil transferase), ALP (fosfatase alcalina), AST (aspartato aminotransferase), ALT (alanina aminotransferase), Hb (hemoglobina), Hc (hematócrito), E<sub>2</sub> (estradiol), FSH (hormônio folículo estimulante), T<sub>3</sub>L (triiodotironina livre), T<sub>4</sub>L (tiroxina livre), TSH (tireotrofina), ABChE (atividade total da BChE), ARC<sub>4/5</sub> (atividade relativa da banda C<sub>4/5</sub>), AAC<sub>4/5</sub> (atividade absoluta da banda C<sub>4/5</sub>), AAC<sub>OF</sub> (atividade absoluta das outras formas moleculares da BChE), ARC<sub>5</sub> (atividade relativa da banda C<sub>5</sub>) e atividades absolutas das 11 bandas (B1 - B11), obtidas após eletroforese em gel de poliacrilamida.

As atividades absolutas (AA) de C<sub>4/5</sub>, C<sub>OF</sub> e das bandas B1 a B11 correspondem às suas atividades relativas (intensidades) multiplicadas pela ABChE.

#### 4.1.2 Segunda Coleta

Foram coletadas 50 amostras de pacientes com um mínimo de 2 e máximo de 8 meses de utilização do hormônio prescrito ( $3,84 \pm 1,43$  meses). As amostras foram obtidas e acondicionadas, da mesma forma que procedido na primeira coleta.

### 4.2 MÉTODOS

Com intuito de evitar que erroneamente alguns valores obtidos, de atividade ou comportamento eletroforético da BChE, pudessem estar relacionados a condições clínicas ou patológicas e não ao uso de HRT, algumas dosagens bioquímicas e hematológicas foram realizadas. Esse rastreamento fez-se necessário para que pudessem ser excluídas amostras com interferências causadas por

anemias (FABER, 1943), disfunções hepáticas (ARCHER; JANOWSKI, 1978), alterações por patologias renais (SIMON et al., 1969), alterações por problemas de tireóide ou por contato com organofosforados (THOMPSON; WHITAKKER, 1965).

A maioria das quantificações foi utilizada nas análises estatísticas, entretanto as enzimas GGT, ALP, AST e ALT não foram incluídas nas análises pelo fato de serem também inibidas pelos estrógenos e, conseqüentemente, dariam altas correlações com as atividades da BChE, após a HRT, interferindo nas demais variáveis. Assim, quando nos referirmos aos exames realizados no Bio Vitae Laboratório, as enzimas não estarão incluídas.

#### 4.2.1 Exames Realizados no Bio Vitae Laboratório

##### 4.2.1.1 Dosagem do hormônio folículo estimulante (FSH)

Técnica: *Enzyme Linked Fluorescent Assay* (ELFA).

Amostra: soro.

Princípio do método: método automatizado, realizado no equipamento miniVidas (Biolab Merieux®) que combina enzimaímunoensaio com detecção final em fluorescência.

##### 4.2.1.2 Dosagem do estradiol (E<sub>2</sub>)

Técnica: *Enzyme Linked Fluorescent Assay* (ELFA).

Amostra: soro.

Princípio do método: método automatizado, realizado no equipamento miniVidas (Biolab Merieux®), que combina método de competição com detecção final em fluorescência.

##### 4.2.1.3 Dosagem do hormônio estimulante da tireóide (TSH)

Técnica: *Enzyme Linked Fluorescent Assay* (ELFA).

Amostra: soro.

Princípio do método: método automatizado, realizado no equipamento miniVidas (Biolab Merieux®) que associa o método imunoenzimático de sanduíche com detecção final em fluorescência.

#### 4.2.1.4 Dosagem da triiodotironina livre ( $T_3L$ )

Técnica: *Enzyme Linked Fluorescent Assay* (ELFA).

Amostra: soro.

Princípio do método: método automatizado, realizado no equipamento miniVidas (Biolab Merieux®) que combina método de competição com detecção final em fluorescência.

#### 4.2.1.5 Dosagem da tiroxina livre ( $T_4L$ )

Técnica: *Enzyme Linked Fluorescent Assay* (ELFA).

Amostra: soro.

Princípio do método: método automatizado, realizado no equipamento miniVidas (Biolab Merieux®), que associa o método imunoenzimático com detecção final em fluorescência.

#### 4.2.1.6 Determinação do hematócrito (Hc)

Técnica: automatizada em equipamento ABX Micro 60.

Amostra: sangue total coletado com EDTA.

Princípio do método: impedância.

#### 4.2.1.7 Dosagem da hemoglobina (Hb)

Técnica: automatizada, em equipamento ABX Micro 60.

Amostra: sangue total coletado com EDTA.

Princípio do método: impedância.

#### 4.2.1.8 Dosagem da fosfatase alcalina (ALP)

Técnica: enzimática, utilizando reativos da marca Analisa Diagnostica, com leitura em equipamento BTS 310 em 590 nm.

Amostra: soro.

Princípio do método: a fosfatase alcalina do soro hidrolisa o substrato timolftaleína monofosfato liberando timolftaleína e fosfato inorgânico. Pela adição de álcali, a ação enzimática é inibida e a timolftaleína adquire cor azul, cuja absorbância é medida fotolorimetricamente. O produto final da reação se constitui de uma cor azul.

#### 4.2.1.9 Dosagem da gama glutamiltransferase (GGT)

Técnica: enzimática, utilizando reativos da marca BioSystems. Leitura no equipamento BTS 310 em 405 nm.

Amostra: soro.

Princípio do método: a GGT catalisa a transferência do grupo gama-glutamil da gama-glutamil-3-carboxil-4-nitroanilida para a glicilglicina, liberando 3-carboxil-4-nitroanilina. A concentração catalítica se determina a partir da velocidade de formação do 3-carboxil-4-nitroanilina.

#### 4.2.1.10 Dosagem da aspartato aminotransferase (AST)

Técnica: enzimática, utilizando reativos da marca BioSystems. Leitura no equipamento BTS 310 em 340 nm.

Amostra: soro.

Princípio do método: AST catalisa a transferência de amino grupo para o 2-oxiglutarato, formando oxalacetato e glutamato. A concentração catalítica é determinada por valores decrescentes de NADH.

#### 4.2.1.11 Dosagem da alanina aminotransferase (ALT)

Técnica: enzimática, utilizando reativos da marca BioSystems. Leitura no equipamento BTS 310 em 340 nm.

Amostra: soro.

Princípio do método: catalisa a transferência de amino grupo da alanina para o 2-oxiglutarato, formando piruvato e glutamato. A concentração catalítica é determinada colocando-se a reação desidrogenase. A partir da velocidade de extinção do NADH.

#### 4.2.1.12 Dosagem do colesterol total (CT)

Técnica: enzimática, utilizando reativos da marca BioSystems. Leitura no equipamento BTS 310 em 505 nm.

Amostra: soro.

Princípio do método: éster de colesterol na amostra +  $H_2O$  na presença de colesterol esterase originam colesterol + ácidos graxos. O colesterol formado +  $\frac{1}{2}O_2$  +  $H_2O$  na presença de Colesterol oxidase, produzem Colesterona +  $H_2O_2$ . Duas moléculas de  $H_2O_2$  + 4-aminoantipirina + fenol na presença de peroxidase, produzem quinoneimina + 4  $H_2O$ .

#### 4.2.1.13 Dosagem do colesterol da lipoproteína de alta densidade (HDL)

Técnica: Reação colorimétrica utilizando reativos marca Wiener Lab., com leitura no equipamento BTS 310 em 505 nm.

Amostra: soro.

Princípio do método: as lipoproteínas de alta densidade (HDL) se separam precipitando seletivamente as lipoproteínas de baixa e muito baixa densidade (LDL e VLDL) mediante o acréscimo de sulfato de dextran de PM 50.000 em presença de íons magnésio. No sobrenadante separado por centrifugação, ficam as HDL e é realizada a determinação do CT ligado às mesmas, empregando-se o sistema enzimático colesterol/oxidase/peroxidase, com colorimetria segundo Trinder (Fenol/4/aminofenazona).



#### 4.2.1.14 Dosagem do colesterol da lipoproteína de baixa densidade (LDL-C)

Técnica: reação colorimétrica utilizando reativos marca Wiener Lab., com leitura no equipamento BTS 310 em 505 nm.

Amostra: soro.

Princípio do método: as lipoproteínas de baixa densidade (LDL ou  $\beta$ -lipoproteínas) separam-se do soro precipitando-as seletivamente pela adição de polímeros de alto peso molecular. Após centrifugar, no sobrenadante ficam as outras lipoproteínas (HDL e VLDL); o CT ligado às mesmas, determina-se utilizando o sistema enzimático colesterol oxidase/peroxidase com colorimetria segundo Trinder (fenol/4-AF). Pela diferença obtida entre o CT e o determinado no sobrenadante, obtém-se o colesterol ligado às LDL.

#### 4.2.1.15 Dosagem dos triglicerídes (TG)

Técnica: enzimática, utilizando reativos da marca BioSystems. Leitura no equipamento BTS 310 em 500 nm.

Amostra: soro.

Princípio do método: os TG presentes na amostra, na presença das enzimas lipase, glicerol quinase, G3P-oxidase e peroxidase, produzem um composto corado (quinonalmina), que se quantifica em espectrofotômetro.

#### 4.2.1.16 Dosagem da glicose (GLC)

Técnica: enzimática, utilizando reativos da marca BioSystems. Leitura no equipamento BTS 310 em 505 nm.

Amostra: plasma fluoretado.

Princípio do método: a glicose da amostra, na presença de glicose oxidase e peroxidase, produz um composto colorido (quinonalmina) que se quantifica por espectrofotometria.

#### 4.2.1.17 Dosagem da uréia

Técnica: enzimática, utilizando reativos da marca BioSystems. Leitura no equipamento BTS 310 em 340 nm.

Amostra: soro.

Princípio do método: a uréia presente na amostra na presença de urease e glutamato desidrogenase consome NADH, que se quantifica espectrofotometricamente.

#### 4.2.1.18 Dosagem da creatinina (CREA)

Técnica: cinética, utilizando reativos da marca BioSystems. Leitura no equipamento BTS 310 em 510 nm.

Amostra: soro.

Princípio do método: a creatinina presente na amostra reage com o picrato em meio alcalino, originando um complexo corado. Mede-se a velocidade de formação desse complexo em períodos iniciais curtos, evitando-se assim a interferência de outros compostos.

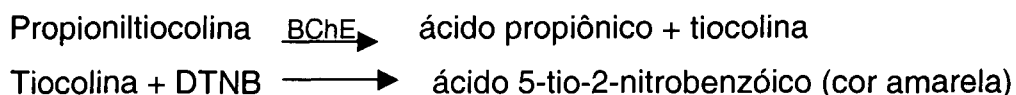
### 4.2.2 Exames Realizados no Laboratório de Bioquímica Clínica da UFPR

#### 4.2.2.1 Determinação da atividade da BChE (ABChE)

Técnica: de DIETZ; RUBINSTEIN; LUBRANO (1973), modificada por EVANS; WROE (1978).

Princípio do método: a propioniltiocolina presente na solução, na presença da BChE, gera radicais sulfidrilas livres, que reagem com DTNB (ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico), formando um produto de cor amarela (ácido 5-tio-2-nitrobenzóico).

O esquema da reação é o seguinte:



# Reativos:

## a) tampão fosfato, pH 7,6:

solução A: fosfato bibásico de sódio anidro (Merck P. A. F-1021786125) 33,3 mM. Solução B: fosfato diácido de potássio anidro (Merck P. A. 311860) 100 mM; adicionar a solução B sobre a solução A até obter o pH (medido em pHmetro) de 7,6 (normalmente em proporção de 6:100, respectivamente). Armazenar a solução em frasco âmbar. A solução é estável por várias semanas a 4°C;

## b) tampão fosfato-DTNB: DTNB (Acros Organics) 0,423 mM em tampão fosfato, pH 7,6. Preparar o reagente de cor 24 horas antes do uso. Estocar em frasco âmbar. Esta solução é estável por 6 meses a 4°C;

## c) substrato de Propioniltiocolina (Sigma P-2880) 100 mM. Acondicionar em frasco âmbar. O reagente é estável por 30 dias a 4°C e 6 meses a -20°C.

Amostra: soro diluído em água destilada 1/100.

Equipamento: espectrofotômetro SIEL Espectromatic 710.

Procedimento: termostatar o equipamento a 25°C em 405 nm. Zerar o equipamento com água destilada. Em um tubo de ensaio acrescentar: 2,2 mL do tampão fosfato-DTNB e 50 µL de substrato. Adicionar 0,25 mL do soro do paciente, previamente diluído (o teste é realizado em duplicata para cada amostra do paciente, permitindo-se um desvio padrão de no máximo 5%). O equipamento automaticamente registrará as leituras de absorbância nos tempos 0, 1, 2 e 3 minutos. Calculando o valor de  $\Delta A/\text{minuto}$  (variação da absorbância por minuto).

Resultados: a atividade da BChE será expressa em kU/L (Quilo Unidades por Litro) a 25°C calculada pelo próprio equipamento, de acordo com a fórmula:

$$\text{kU/L} = \Delta A/\text{minuto} \times 75,19$$

$$\text{Sendo o fator 75,19 obtido de: } \frac{1}{\epsilon_{405 \text{ nm}} \times d} \times \frac{VT}{VA}$$

onde  $\epsilon_{405\text{nm}}$  (coeficiente de extinção milimolar do DTNB em cubeta de 1 cm a 405 nm) = 13,6.

d = diâmetro da cubeta (1 cm).

VT = volume total da cubeta (2,5 mL).

VA = volume da amostra (0,0025 mL).

Esse resultado de atividade da BChE representa a degradação de 1 $\mu$ Mol de substrato/minuto/mL .

Não há desconto da hidrólise espontânea do substrato, através de um tubo controle, uma vez que, nestas condições do ensaio, esta hidrólise é muito baixa ( $\Delta A/\text{minuto} = 0,001$ ), não influenciando o resultado final.

#### 4.2.2.2 Determinação dos fenótipos do loco *CHE2* e quantificação da banda $C_5$

Técnica: desenvolvida originalmente por ROBINSON et al. (1957), aplicada para a BChE por VAN ROS; VERVOORT (1973) e modificada por FADEL-PICHETH (1991).

Reagentes:

- a) solução de ácido cítrico (Merck P. A. K-91669744 973) 1,56 M. Acondicionar em frasco âmbar. Estável por várias semanas a 4°C;
- b) solução estoque de tampão citrato de sódio (Nuclear P. A. 311902) 500 mM. Ajustar o pH a 6,5 com solução de ácido cítrico. Acondicionar em frasco âmbar. Estável por várias semanas a 4°C;
- c) tampão citrato de sódio 50 mM, pH 6,5. Preparar no dia do uso, a partir da solução estoque, acertando o pH com ácido cítrico a 30%;
- d) tampão fosfato de sódio (Merck P. A. F-1021786125) 200 mM, pH 7,1;
- e) substrato de  $\alpha$ -naftilacetato (Sigma N8505) 30 mM;

- f) cromógeno-substrato: preparar no momento de uso uma solução de Fast Red TR Salt (Acros Orgânicos A-015647801) a 0,25% p/v em tampão fosfato, pH 7,1. Após dissolução, acrescentar  $\alpha$ -naftilacetato 30 mM na proporção de 3,5% v/v;

Preparo da placa de eletroforese: preparar 40 mL de uma solução de Bacto Ágar (Difco 1045001) a 1,4% p/v em tampão citrato de sódio 50 mM, pH 6,5. Aquecer essa mistura até completa dissolução do ágar (em torno de 7 minutos). Verter o ágar ainda quente sobre uma placa de vidro de 230 x 160 mm contendo espaçadores laterais (dois de 230 x 10 mm e dois de 160 X 10 mm), previamente fixados à placa com vaselina sólida, (com distância aproximada de 10 mm de cada borda).

Esperar solidificar (a placa pode ser preparada um dia antes do uso. Isso diminui o efeito eletroendosmótico).

Corrida eletroforética: sobre o ágar solidificado, aplicar 1  $\mu$ L de amostra (soro) com auxílio de uma lâmina de metal (5 x 5 x 0,1 mm). Submeter a placa à eletroforese, usando-se como tampão de corrida o tampão citrato de sódio 50 mM, pH 6,5 distribuído nas cubas de eletroforese. Um pano (Perfex) umedecido no tampão é colocado dos dois lados do gel. A corrida eletroforética é realizada por 3 horas e meia, a 4°C, aplicando-se cerca de 30mA e 75V. O aparato para a realização dessa eletroforese encontra-se esquematizado na FIGURA 3.

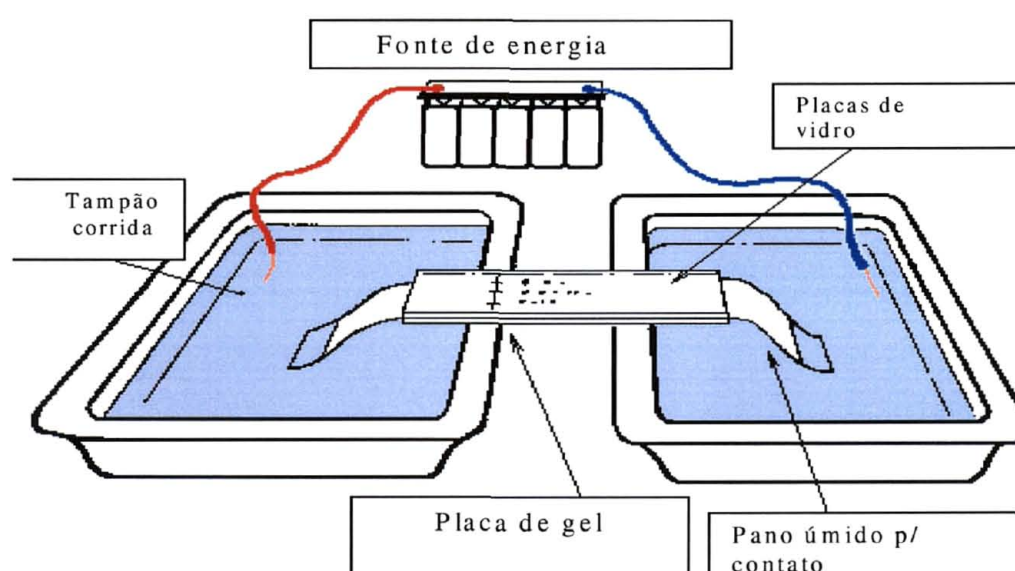
Para cada corrida eletroforética foram confeccionadas duas placas. Amostras CHE2 C5- e CHE2 C5+ foram utilizadas como controle da metodologia e cada amostra de soro foi aplicada uma vez em cada placa, sendo realizadas pelo menos duas corridas de cada amostra. As amostras que apresentaram valores diferentes (> 10%) nas duas placas foram repetidas. Isso ocorreu em aproximadamente 3% das amostras.

Revelação da corrida: após a corrida verter sobre a placa o cromógeno-substrato recém preparado e incubar por 1 hora, a 37°C para revelação das bandas. Depois da revelação, lavar a placa com água destilada a fim de retirar o excesso de corante.

Realizar a secagem colocando o gel entre 1 folha de papel cartão (no qual ele se adere) e folhas de papel de filtro. Realizar várias trocas dos papéis de filtro, até a

secagem do gel. Por último, manter o gel entre o papel cartão e os papeis de filtros, colocando-o sob peso para a completa secagem.

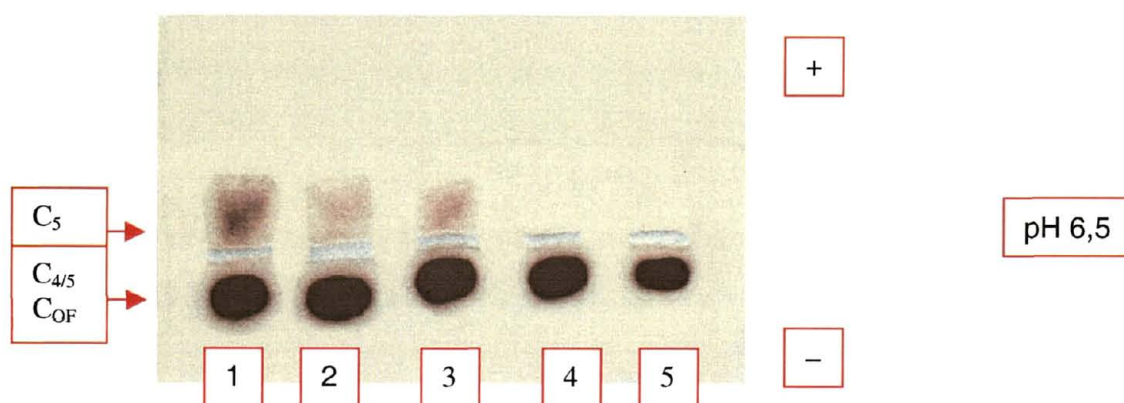
FIGURA 3 - APARATO PARA ELETROFORESE EM GEL DE ÁGAR.



Quantificação das bandas: primeiramente o gel é escaneado pelo programa de computador KODAK DIGITAL - Corel Photo Paint 9 (1999) e quantificado pelo programa de computador KODAK 1D - Image Analysis Software for Windows (1992 - 2000).

Um fragmento da eletroforese em gel de ágar pH 6,5, encontra-se na FIGURA 4, mostrando o deslocamento da banda  $C_5$ , de indivíduos de fenótipo CHE2  $C_5^+$ , para o pólo positivo (+), enquanto as outras formas moleculares, se deslocam para o pólo negativo (-), inclusive a fração  $C_{4/5}$ .

FIGURA 4 - FRAGMENTO DE UMA ELETROFORESE EM GEL DE ÁGAR, pH 6,5, MOSTRANDO O DESLOCAMENTO DAS BANDAS DE INDIVÍDUOS CHE2 C5+ (1 A 3) PARA O PÓLO POSITIVO E A FALTA DAS BANDAS EM INDIVÍDUOS DE FENÓTIPO CHE2 5- (4 E 5)

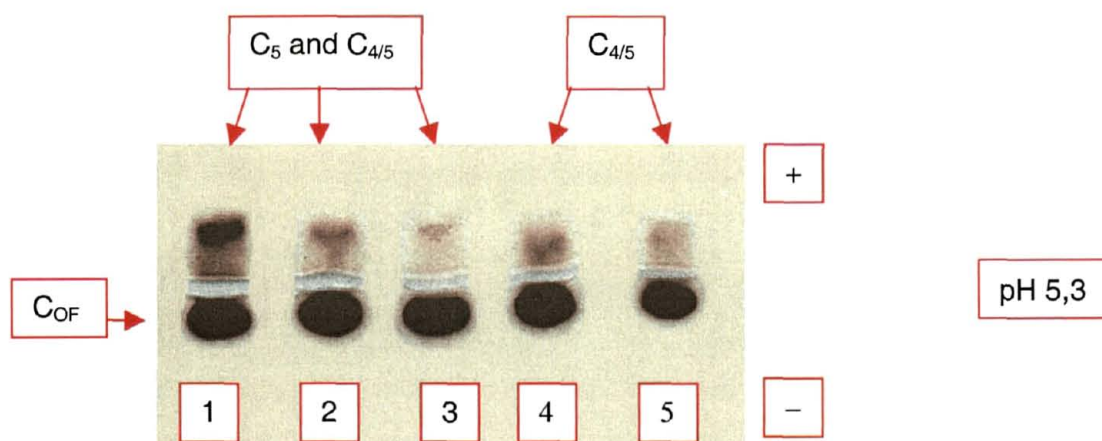


#### 4.2.2.3 Quantificação das bandas $C_{4/5}$

Para a quantificação das bandas  $C_{4/5}$  (das mulheres de fenótipo CHE2  $C_5 -$ ) foram realizadas eletroforeses de acordo como item 4.2.2.2, porém com modificações de SOUZA (1995), que alterou o pH da solução de Bacto ágar para 5,3. A corrida eletroforética foi realizada por 3 horas.

Na FIGURA 5 encontra-se um fragmento de gel de ágar , pH 5,3, mostrando o deslocamento das bandas  $C_{4/5}$  e  $C_5$  de indivíduos de fenótipo CHE2  $C_5+$ , e das bandas  $C_{4/5}$  de indivíduos de fenótipo CHE2  $C_5-$  para o pólo (+), enquanto as outras formas moleculares ( $C_{OF}$ ) se movem para o pólo (-).

FIGURA 5 - FRAGMENTO DE ELETROFORESE EM GEL DE ÁGAR, pH 5,3, ONDE SE PODE OBSERVAR O DESLOCAMENTO DAS BANDAS  $C_{4/5}$  E  $C_5$  DE INDIVÍDUOS DE FENÓTIPO CHE2  $C5+$  (1 A 3) PARA O PÓLO (+) ASSIM COMO DAS BANDAS  $C_{4/5}$  DE INDIVÍDUOS DE FENÓTIPO CHE2  $C5-$  (4 E 5), ENQUANTO AS OUTRAS FORMAS MOLECULARES ( $C_{OF}$ ) MOVEM-SE PARA O PÓLO (-)



#### 4.2.2.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida

Esse protocolo foi baseado em SAMBROOK; FRISCH; MANIATIS, (1989). Porém utilizando três diferentes concentrações.

Reagentes:

a) solução estoque de poliacrilamida 30%;

acrilamida (Gibco U.P. K31397603306) 29,0 g;

N,N'- Metilenobisacrilamida (Pharmacia Biotech K29161617129) 1,0 g;

água destilada q.s.p..... 100,0 mL.

Aquecer a solução a 37° para completa dissolução, acondicionar em frasco escuro a 4°C. Estável por várias semanas;

b) solução tampãoTBE 5X (89mM):

tampão Tris (Siga P. A. 11H5607) ..... 54,0 g;



ácido bórico (Gibco BRL U. P. 1024779) ..... 27,5 g;  
 EDTA 0,5M, pH 8,0 (Merck P. A. K27779818038) ..... 20,0 mL;  
 água destilada q.s.p. .... 1000,0 mL;

c) persulfato de amônia 10% (Merck P. A. K28338101-046);

d) tampão de corrida: TBE 1X (TBE 5x diluído em 4 partes de água destilada);

e) solução de corantes para eletroforese:

preparo de azul de bromofenol, conforme o esquema a seguir:

Material	Concentração	Solução Estoque	Volume p/ 50 mL
TRIS pH 7,6	200 mM	2,0 M	25,0 mL
EDTA	200 mM	0,4 M	12,5 mL
SDS	2 %	10 %	5,0 mL
Azul Bromofenol	0,4 %	-	0,1 g
Água destilada	-	-	50,0 mL

misturar uma parte dessa solução com 3 partes de sucrose a 50%.

Acondicionar a 4°C.

Preparo de azul de xilenocianol, conforme o esquema a seguir:

Material	Concentração	Solução Estoque	Volume p/ 50 mL
TRIS pH 7,6	200 mM	2,0 M	25,0 mL
EDTA	200 mM	0,4 M	12,5 mL
SDS	2 %	10 %	5,0 mL
Xilenocianol	0,4 %	-	0,1 g
Água destilada	-	-	50,0 mL

misturar uma parte dessa solução com 3 partes de sucrose 50%.

Acondicionar a 4°C.

Preparo da solução para diluir a amostra:

misturar 1 parte da solução de azul de bromofenol com 1 parte da solução

de xilenocianol e acondicionar a 4°C.

f) tampão fosfato de sódio (Merck P. A. F1021786125) 200 mM, pH 7;

g) substrato de  $\alpha$ -naftilacetato (Sigma N8505) 30 mM;

h) cromógeno-substrato: preparar no momento de uso uma solução de Fast Red TR Salt (Acrós Organics A-015647801) a 0,25% p/v em tampão fosfato, pH 7,1. Após dissolução, acrescentar  $\alpha$ -naftilacetato 30 mM na proporção de 3,5% v/v;

i) TEMED (Gibco BRL U. P. 1020497), peso molecular 116,21.

Preparação do gel: o gel de corrida é preparado com colocação de diferentes concentrações de poliacrilamida entre duas placas de vidro, contendo espaçadores, devidamente afixados em suporte (FIGURA 6).

Cada placa de poliacrilamida consta de 3 concentrações diferentes (TABELA 14), com respectivas larguras:

gel de alinhamento .....5,0%; 1,0 cm.

géis de separação ..... 7,5%, 3,0 cm e 11%; 10,0 cm.

TABELA 14 – VOLUMES DOS REAGENTES UTILIZADOS PARA O PREPARO DOS GÉIS DE POLIACRILAMIDA

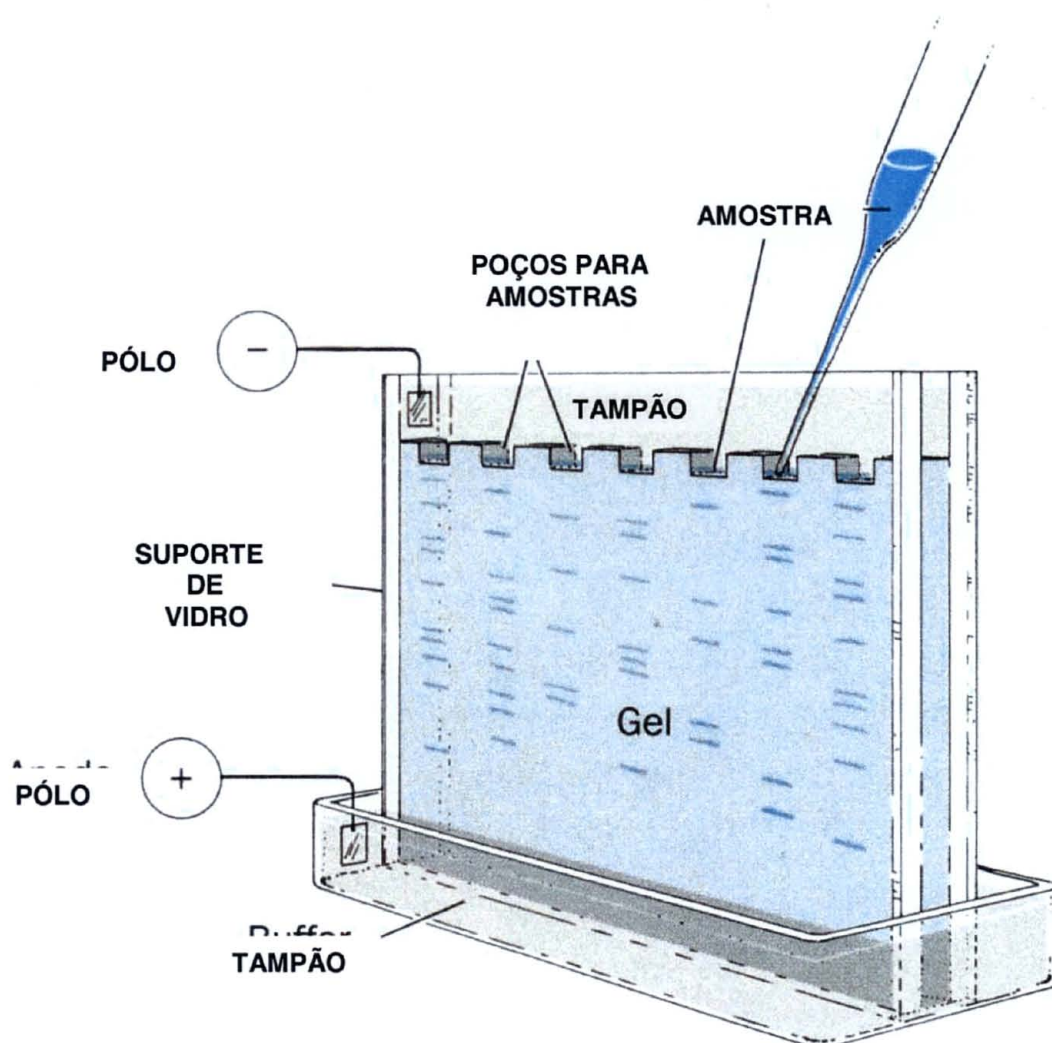
Reativo	11,5%	7,0%	5,0%
Poliacrilamida 30 %	11,5 mL	3,5 mL	2,5 mL
Água destilada	12,5 mL	8,5 mL	9,5 mL
TBE 5x	6,0 mL	3,0 mL	3,0 mL
Persulfato 10 %	250 $\mu$ L	125 $\mu$ L	125 $\mu$ L
TEMED	30 $\mu$ L	15 $\mu$ L	15 $\mu$ L

Corrida eletroforética: misturar 2,5  $\mu\text{L}$  de soro com 7,5  $\mu\text{L}$  de solução corante de diluição das amostras. Aplicar 10  $\mu\text{L}$  dessa mistura em cada poço. A corrida ocorre por 24 horas a 4°C a 130 V e 13 mA, utilizando-se o tampão, de corrida, diluído conforme item d.

Revelação da corrida: após a corrida o gel é retirado e colocado em suporte. Sobre ele, verter o cromógeno-substrato, recém preparado e incubar por 60 minutos, a 37°C. Após a revelação das bandas, lavar o gel com água destilada para retirar o excesso de corante e colocar entre duas folhas de transparências.

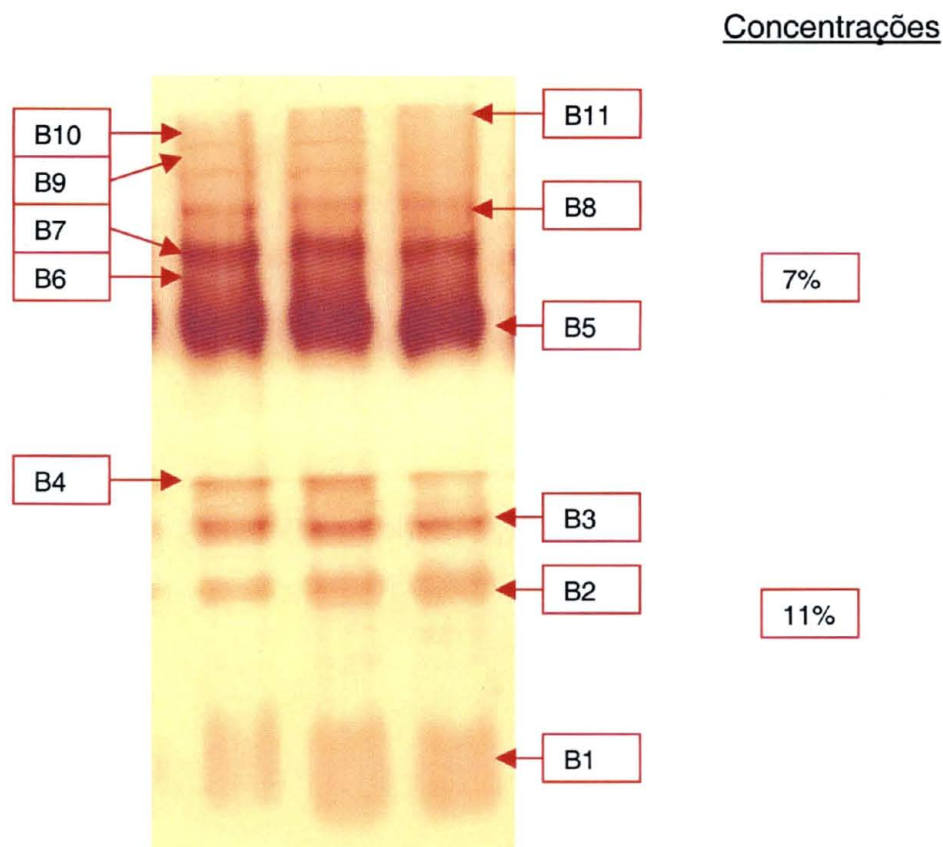
Quantificações das bandas da BChE: o gel é escaneado pelo programa de computador KODAK DIGITAL- Corel Photo Paint 9 (1999) e em seguida, quantificado pelo programa de computador KODAK 1D - Image Analysis Software for Windows (1992 - 2000).

FIGURA 6 - APARATO PARA ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA



Na FIGURA 7 encontra-se um fragmento desta eletroforese mostrando as bandas que normalmente são visualizadas.

FIGURA 7 - FRAGMENTO DE ELETROFORESE, EM GEL DE POLIACRILAMIDA MOSTRANDO AS 11 BANDAS (B1 - B11) VISUALIZADAS NAS CONCENTRAÇÕES DE 7 E 11%



(B1 = MONÔMERO; B2 = MONÔMERO LIGADO À ALBUMINA; B3 = DÍMERO; B4 = TRÍMERO; B5 = TETRÂMERO; B6 A B11 = BChE LIGADA A SUBSTÂNCIAS DESCONHECIDAS).

#### 4.2.2.5 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas no programa STATISTICA (STATSOFT, 1985) para Windows, versão 1996, em computadores do Laboratório de Bioquímica Clínica do Depto. de Patologia Médica da UFPR.

Foram realizadas análises descritivas, de correlações simples e de regressões múltiplas escalonadas. Utilizaram-se, também, testes t de Student para

amostras dependentes e independentes, além do teste do qui-quadrado ( $\chi^2$ ). No caso da correlação simples, foram realizados gráficos de dispersão, os quais mostraram que as correlações significativas encontradas eram lineares e no caso das regressões múltiplas, foram realizados gráficos para verificar a normalidade das variâncias.

Foi empregado o seguinte modelo de regressão múltipla:

$$Y = a + \sum_{i=1}^n b_i x_i + e,$$

onde Y = variável dependente;

a = intercepto múltiplo;

$b_i$  = i - ésimo elemento do vetor de coeficientes parciais de regressão;

$x_i$  = i - ésima variável independente incluída no modelo;

e = desvio de Y que não é explicado pela regressão.

## 5 RESULTADOS

Das 60 mulheres que fizeram uso de HRT, retornaram para a segunda coleta somente 50 delas. Destas, 6 utilizaram isoflavona, 16 Tibolona, 3 somente estradiol, 16 estradiol mais norestisterona, 5 estradiol mais acetato de medroxiprogesterona, 4 valerato de estradiol mais acetato de ciproterona, em formulações orais.

Das amostras do referido trabalho, compostas por 60 mulheres, 6 (seis) apresentaram fenótipos CHE2 C5+. A frequência desse fenótipo foi de  $10,0\% \pm 3,9\%$ .

O fenótipo CHE2 C5+ tem mostrado comportamento diferente do fenótipo CHE2 C5- em diversos trabalhos (HARRIS et al., 1963; SCOTT; POWERS, 1972; CHAUTARD-FREIRE-MAIA et al., 1991; ALCÂNTARA et al., 2002; ALCÂNTARA et al., 2003a; ALCÂNTARA et al., 2003b). Assim sendo, os resultados das amostras destes 2 fenótipos foram analisadas separadamente.

### 5.1 ANÁLISES DAS 54 MULHERES DE FENÓTIPO CHE2 C5-, ANTES DO USO DE HRT

#### 5.1.1 Análises Descritivas de algumas Variáveis antes do Uso de HRT

Na TABELA 15, encontram-se os valores médios obtidos para algumas variáveis estudadas com os respectivos desvios padrões, amplitudes de variação e valores de referência. Foram também introduzidos nesta TABELA, os valores de referência para os diferentes parâmetros analisados para as variáveis da BChE, obtidos de resultados encontrados em pesquisas realizadas no Laboratório de Bioquímica Clínica da UFPR (dados não publicados), de bulas dos kits e da literatura.

Das 60 mulheres analisadas, algumas mostraram resultados acima dos valores de referência para os seguintes exames: ABChE = 26%;  $ARC_{4/5}$  = 15%;  $AAC_{4/5}$  = 26% e  $AAC_{OF}$  = 10%; IMC = 31,5%; CT = 57,4%; TG = 16,7%; LDL-C =

72,2%; GLC = 9,3%; TSH = 16,7%; FSH = 83,3%; Hb = 13,0%; Hc = 24,1%, e  $E_2$  = 20,4%. Apresentaram níveis diminuídos de:  $E_2$  = 79,6%; HDL-C = 33,3%; TSH = 5,6%; Hb = 1,9%; Hc = 1,9%. Estas porcentagens estão representadas no GRÁFICO 1.

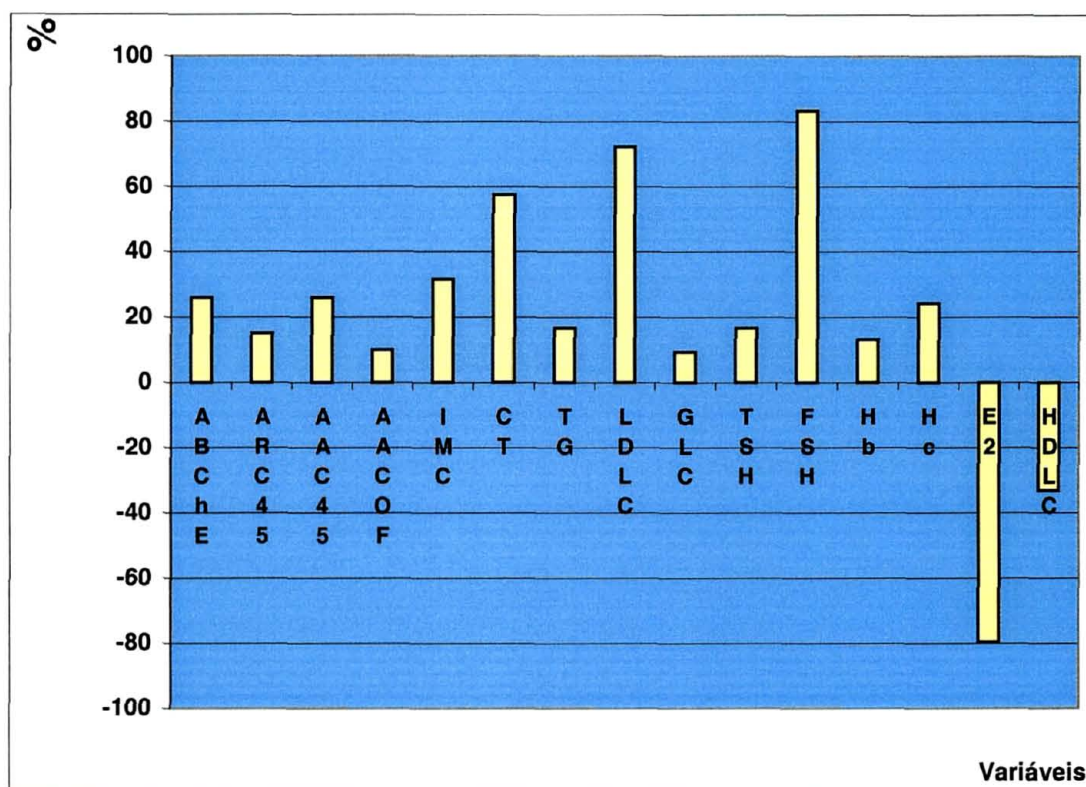
TABELA 15 - MÉDIAS (M)  $\pm$  DESVIOS PADRÕES (DP) E AMPLITUDES DE VARIAÇÃO (AV) DE ALGUMAS VARIÁVEIS ANALISADAS NO PRESENTE ESTUDO, EM 54 MULHERES CLIMATÉRICAS DE FENÓTIPO CHE2 C5-, ANTES DO USO DE HRT

Variáveis	M $\pm$ DP (AV)	VR
ABChE (kU/L)	5,91 $\pm$ 1,05 ( 3,71 - 8,12)	2,47 - 6,80•
ARC <sub>4/5</sub> (%)	15,89 $\pm$ 3,19 ( 9,95 - 21,55)	4,24 - 22,35•
AAC <sub>4/5</sub> (kU/L)	0,95 $\pm$ 0,30 ( 0,37 - 1,60)	0,10 - 1,39•
AAC <sub>OF</sub> (kU/L)	4,96 $\pm$ 0,82 ( 3,27 - 6,62)	2,37 - 6,30•
Idade (anos)	52,30 $\pm$ 6,78 ( 38,00 - 75,00)	
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	24,09 $\pm$ 3,36 ( 14,95 - 33,78)	< 25,00♦
CT (mg/dL)	213,52 $\pm$ 46,01 (144,00 - 341,00)	< 200,00♣
HDL-C (mg/dL)	45,26 $\pm$ 9,72 ( 29,00 - 73,00)	> 40,00♣
LDL-C (mg/dL)	127,17 $\pm$ 41,92 ( 61,00 - 258,00)	< 100,00♣
TG (mg/dL)	110,81 $\pm$ 55,62 ( 38,00 - 286,00)	< 150,00♣
GLC (mg/dL)	90,87 $\pm$ 24,57 ( 68,00 - 225,00)	70,00 - 110,00
TSH ( $\mu$ UI/mL)	2,80 $\pm$ 2,67 ( 0,05 - 15,16)	0,25 - 5,00
T <sub>3</sub> L (pmol/L)	4,74 $\pm$ 0,53 ( 3,81 - 5,82)	4,00 - 8,30
T <sub>4</sub> L (ng/dL)	0,94 $\pm$ 0,15 ( 0,70 - 1,30)	0,80 - 2,60
$E_2$ (pg/mL)	32,58 $\pm$ 40,71 ( 9,00 - 194,43)	< 58,00 $\Theta$
FSH (mUI/mL)	57,64 $\pm$ 31,49 ( 2,56 - 112,00)	17,00 - 95,00 $\Theta$
Uréia (mg/dL)	31,50 $\pm$ 8,01 ( 12,00 - 49,00)	10,00 - 50,00
CREA (mg/dL)	0,90 $\pm$ 0,12 ( 0,70 - 1,20)	0,40 - 1,40
Hb (g/dL)	14,05 $\pm$ 1,13 ( 10,20 - 16,90)	12,00 - 15,00
Hc (%)	42,44 $\pm$ 3,19 ( 34,00 - 52,00)	36,00 - 45,00

$\Theta$  = valores de referência para o climatério; IMC = índice de massa corporal; CT = colesterol total; TG = triglicérides; GLC = glicose; CREA = creatinina; Hb = hemoglobina; Hc = hematócrito; • = dados obtidos no Laboratório de Bioquímica Clínica da UFPR; ♣ = III Diretrizes Brasileiras sobre dislipidemias e Diretrizes da prevenção da aterosclerose, 2001; ♦ = segundo ABESO. Os demais parâmetros estão de acordo com os valores indicados pelas metodologias utilizadas para análises.



GRÁFICO 1 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS PORCENTAGENS DOS VALORES MÉDIOS ALTERADOS EM DIFERENTES ANÁLISES, NAS 54 MULHERES CLIMATÉRICAS



CT = colesterol total; TG = triglicérides; GLC = glicose; Hb = hemoglobina; Hc = hematócrito.

### 5.1.2 Análises de Correlação Simples, entre as Atividades da BChE e algumas Variáveis antes do Uso de HRT

Na TABELA 16, encontram-se os resultados das análises de correlação simples entre a atividade total da BChE (ABChE), a atividade relativa do complexo  $C_{4/5}$  (ARC $_{4/5}$ ), atividade absoluta do complexo  $C_{4/5}$  (AAC $_{4/5}$ ) e atividade absoluta das outras formas moleculares da BChE (AAC $_{OF}$ ) com os demais parâmetros estudados, destacando-se em vermelho, as variáveis que apresentaram médias diferentes significativamente.

Resultados de correlação simples entre as variáveis analisadas no Bio Vitae Laboratório, encontram-se na TABELA 17, destacando-se em vermelho aquelas que apresentaram médias diferentes significativamente.



TABELA 16 - ANÁLISES DE CORRELAÇÃO SIMPLES ENTRE AS ATIVIDADES DA BChE E ALGUMAS VARIÁVEIS ANALISADAS NO PRESENTE ESTUDO, EM 54 MULHERES CLIMATÉRICAS DE FENÓTIPO CHE2 C5-, ANTES DO USO DE HRT

Variáveis	ABChE (p)	ARC <sub>4/5</sub> (p)	AAC <sub>4/5</sub> (p)	AAC <sub>OF</sub> (p)
IMC	0,31 (< 0,05)	-0,10 (> 0,40)	0,11 (> 0,40)	0,35 (< 0,01)
CT	0,38 (< 0,01)	0,23 (> 0,05) <sup>o</sup>	0,36 (< 0,01)	0,36 (< 0,01)
HDL-C	-0,34 (< 0,05)	-0,27 (< 0,05)	-0,36 (< 0,01)	-0,30 (< 0,05)
LDL-C	0,35 (= 0,01)	0,18 (> 0,10)	0,31 (< 0,05)	0,33 (< 0,05)
TG	0,30 (< 0,05)	0,21 (> 0,10)	0,31 (< 0,05)	0,28 (< 0,05)
GLC	0,27 (= 0,05)	-0,09 (> 0,50)	0,07 (> 0,50)	0,32 (< 0,05)
T <sub>3</sub> L	0,26 (> 0,05) <sup>o</sup>	0,22 (> 0,10)	0,27 (> 0,05) <sup>o</sup>	0,23 (> 0,05) <sup>o</sup>
T <sub>4</sub> L	0,30 (< 0,05)	0,22 (> 0,10)	0,28 (< 0,05)	0,29 (< 0,05)
E <sub>2</sub>	-0,29 (< 0,05)	-0,19 (> 0,10)	-0,27 (< 0,05)	-0,27 (= 0,05)
Hb	0,31 (< 0,05)	0,07 (> 0,50)	0,21 (> 0,10)	0,32 (< 0,05)
Hc	0,33 (< 0,05)	0,03 (> 0,80)	0,20 (> 0,10)	0,35 (= 0,01)

Somente entraram nesta tabela as variáveis que apresentaram correlações significativas ou próximas à significância em pelo menos um modelo. <sup>o</sup> = valores próximos à significância; IMC = índice de massa corporal; CT = colesterol total; TG = triglicérides; GLC = glicose; Hb = hemoglobina; Hc = hematócrito.

TABELA 17 - CORRELAÇÕES SIMPLES ENTRE ALGUMAS VARIÁVEIS ANALISADAS NO PRESENTE TRABALHO, DE 54 MULHERES CLIMATÉRICAS DE FENÓTIPO CHE2 C5-, ANTES DO USO DE HRT

Variáveis	Idade (p)	IMC (p)	CT (p)	HDL-C (p)	LDL-C (p)	TG (p)	GLC (p)
IMC	0,39 (< 0,01)						
HDL-C		-0,27 (> 0,05) <sup>o</sup>	-0,26 (> 0,05) <sup>o</sup>				
LDL-C	0,29 (< 0,05)		0,86 (< 0,001)	-0,30 (< 0,05)			
TG	0,24 (> 0,05) <sup>o</sup>	0,26 (> 0,05) <sup>o</sup>	0,53 (< 0,001)	-0,38 (< 0,01)	0,54 (< 0,001)		
GLC	0,37 (< 0,01)	0,36 (< 0,01)				0,30 (< 0,05)	
TSH				0,25 (> 0,05) <sup>o</sup>			
T <sub>4</sub> L	0,33 (< 0,05)						0,37 (< 0,01)
E <sub>2</sub>	-0,31 (< 0,05)	-0,43 (= 0,001)					-0,23 (> 0,05) <sup>o</sup>
FSH	0,24 (> 0,05) <sup>o</sup>	0,24 (> 0,05) <sup>o</sup>					
Uréia	0,23 (> 0,05) <sup>o</sup>						
Hb	0,47 (< 0,001)	0,27 (< 0,05)					0,45 (= 0,001)
Hc	0,49 (< 0,001)	0,29 (< 0,05)				0,33 (< 0,05)	0,52 (< 0,001)

Variáveis	T <sub>3</sub> L (p)	T <sub>4</sub> L (p)	E <sub>2</sub> (p)	Uréia (p)	Hb (p)
E <sub>2</sub>	-0,29 (< 0,05)	-0,26 (> 0,05) <sup>o</sup>			
FSH			-0,51 (< 0,05)		
Uréia	0,24 (> 0,05) <sup>o</sup>				
CREA		0,28 (< 0,05)	-0,25 (> 0,05) <sup>o</sup>	0,35 (< 0,01)	
Hb		0,31 (< 0,05)	-0,39 (< 0,01)		
Hc		0,32 (< 0,05)	-0,35 (= 0,01)	0,27 (< 0,05)	0,94 (< 0,001)

Somente entraram nesta tabela as variáveis que apresentaram correlações significativas ou próximas à significância. <sup>o</sup> = valores próximos à significância; IMC = índice de massa corporal; TG = triglicérides; GLC = glicose; CREA = creatinina; Hb = hemoglobina; Hc = hematócrito.

### 5.1.3 Análises de Regressão Múltipla Escalonada, antes do Uso de HRT

A análise de regressão múltipla escalonada é um modelo de regressão que permite selecionar as variáveis independentes por ordem decrescente de intensidade de sua correlação com a variável dependente. Assim, se duas ou mais variáveis independentes se correlacionam com a dependente, por estarem correlacionadas entre si, somente aquela que está mais correlacionada entra no modelo. Também, através do coeficiente de determinação ( $r^2$ ) pode-se saber quanto as variáveis independentes que entraram no modelo, explicaram da variação da variável dependente.

Na TABELA 18 encontram-se os resultados das análises de regressão múltipla escalonada, tendo como dependentes as variáveis ABChE,  $ARC_{4/5}$ ,  $AAC_{4/5}$  e  $AAC_{OF}$  e como independentes as variáveis analisadas no Bio Vitae Laboratório. Pode-se observar, que antes do uso de HRT, ABChE correlacionou-se positiva e significativamente com CT e Hb e negativamente com HDL-C. As variáveis incluídas nesse modelo, de acordo com o coeficiente de determinação ( $r^2$ ) respondem por 31% da variação de ABChE.

$ARC_{4/5}$  mostrou-se correlacionada negativa e significativamente somente com HDL-C. A variável incluída nesse modelo, de acordo com o  $r^2$ , respondeu por 7% da variação de  $ARC_{4/5}$ .

$AAC_{4/5}$  está correlacionada positivamente com CT e  $T_4L$  e negativamente com HDL-C. De acordo com o  $r^2$  essas variáveis responderam por 28% da variação de  $AAC_{4/5}$ .

Quanto a  $AAC_{OF}$ , mostrou-se correlacionada positiva e significativamente com CT, IMC e Hc e de acordo com o  $r^2$  essas variáveis respondem por 30% de sua variação.

**TABELA 18 - ANÁLISES DE REGRESSÃO MÚLTIPLA ESCALONADA, TENDO AS VARIÁVEIS DA BChE COMO DEPENDENTES, EM AMOSTRAS DE 54 MULHERES CLIMATÉRICAS DE FENÓTIPO CHE2 C5-, ANTES DO USO DE HRT**

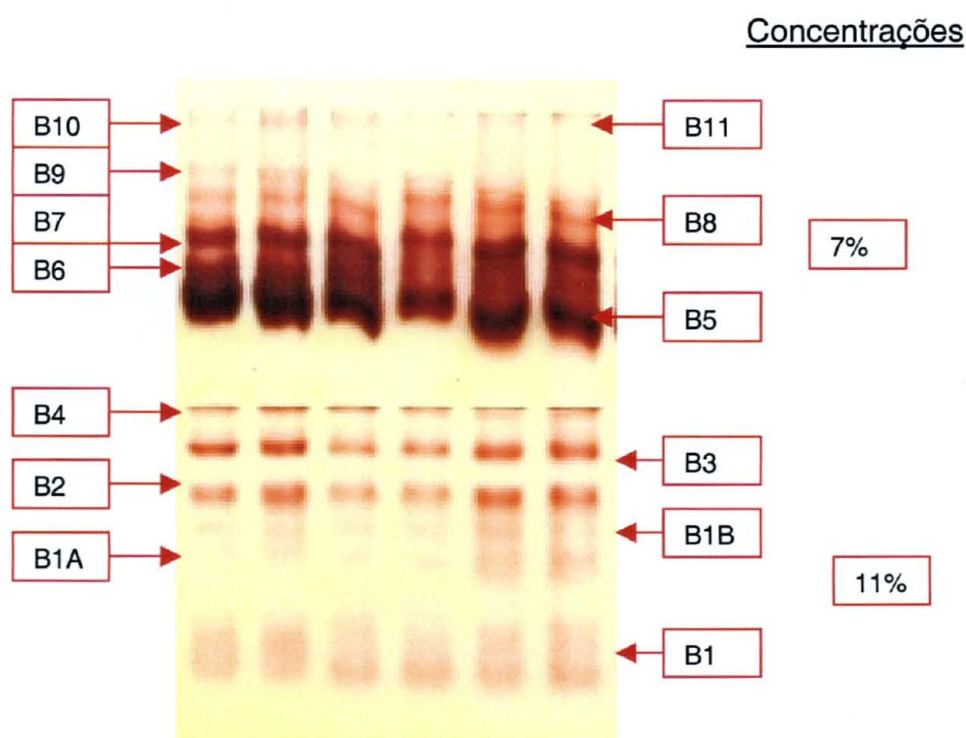
Variáveis Dependentes	Variáveis independentes						
	CT	HDL-C	IMC	T <sub>4</sub> L	Hb	Hc	r <sup>2</sup>
ABChE	+ *	- *	0	0	+ *	0	0,31
ARC <sub>4/5</sub>	0	- *	0	0	0	0	0,07
AAC <sub>4/5</sub>	+ *	- *	0	+ *	0	0	0,28
AAC <sub>OF</sub>	+ **	0	+ *	0	0	+ *	0,30

Foram consideradas as variáveis analisadas no Bio Vitae Laboratório como independentes. Encontram-se incluídas na tabela, somente as variáveis significativas em pelo menos um modelo. IMC = índice de massa corporal; CT = colesterol total; Hb = hemoglobina; Hc = hematócrito; + = correlação positiva; - = correlação negativa; 0 = variável com resultado não significativo; \* = p < 0,05; \*\* = p < 0,01.

#### 5.1.4 Análises de Correlação Simples entre as Atividades Absolutas das 13 Bandas da BChE e algumas Variáveis, antes do Uso de HRT

Em gel de poliacrilamida foram evidenciadas no presente trabalho, 11 bandas da BChE (B1 - B11) e mais duas, que normalmente sem relatos na literatura de estarem presentes em mulheres mais jovens (FIGURA 8). Essas duas bandas foram denominadas B1A (apareceu em 89% das mulheres climatéricas) e B1B (apareceu em 94% das mulheres climatéricas), pois se encontram entre B1 e B2. As atividades absolutas destas 13 bandas foram correlacionadas com as demais variáveis analisadas no Bio Vitae Laboratório e só foram introduzidas na TABELA 19, aquelas que apresentaram correlações significativas ou próximas à significância.

FIGURA 8 - FRAGMENTO DE ELETROFORESE, EM GEL DE POLIACRILAMIDA, MOSTRANDO AS 13 BANDAS



(B1 - B11 MAIS B1A E B1B) VISUALIZADAS NAS CONCENTRAÇÕES DE 7 E 11%. (B1 = MONÔMERO; B2 = MONÔMERO LIGADO À ALBUMINA; B3 = DÍMERO; B4 = TRÍMERO; B5 = TETRÂMERO; B6 A B11 = BCHE LIGADA A SUBSTÂNCIAS DESCONHECIDAS).



TABELA 19 - CORRELAÇÕES SIMPLES ENTRE AS ATIVIDADES DAS 13 BANDAS DA BChE E ALGUMAS VARIÁVEIS ANALISADAS OBTIDAS DE 54 MULHERES CLIMATÉRICAS DE FENÓTIPOS CHE2 C5-, ANTES DO USO DE HRT

Variáveis	AB1 (p)	AB1A (p)	AB1B (p)	AB2 (p)	AB3 (p)	AB4 (p)	AB5 (p)
Idade						0,37 (< 0,01)	
CT						0,43 (= 0,001)	0,36 (< 0,01)
HDL-C	-0,34 (= 0,01)						
LDL-C						0,30 (< 0,05)	0,29 (< 0,05)
TG	0,25 (> 0,05) <sup>o</sup>						0,28 (< 0,05)
GLC	0,44 (= 0,001)		0,34 (< 0,05)	0,44 (= 0,001)	0,25 (> 0,05) <sup>o</sup>		
TSH		-0,25 (> 0,05) <sup>o</sup>					
T <sub>4</sub> L		0,33 (< 0,05)		0,24 (> 0,05) <sup>o</sup>		0,32 (< 0,05)	
E <sub>2</sub>				-0,28 (< 0,05)	-0,23 (> 0,05) <sup>o</sup>	-0,36 (< 0,01)	
Hb	0,36 (< 0,01)					0,26 (> 0,05) <sup>o</sup>	
Hc	0,35 (< 0,01)					0,25 (> 0,05) <sup>o</sup>	0,27 (< 0,05)
Variáveis	AB6 (p)	AB7 (p)	AB8 (p)	AB9 (p)	AB10 (p)	AB11 (p)	
Idade	0,24 (> 0,05) <sup>o</sup>						
IMC		0,31 (< 0,05)					
CT		0,30 (< 0,05)			0,29 (< 0,05)		
T <sub>3</sub> L	0,31 (< 0,05)				0,38 (< 0,01)		
T <sub>4</sub> L			0,34 (< 0,05)	0,23 (> 0,05) <sup>o</sup>			
E <sub>2</sub>						-0,28 (< 0,05)	
Uréia	0,29 (< 0,05)						
Hb				0,25 (> 0,05) <sup>o</sup>			
Hc				0,23 (> 0,05) <sup>o</sup>			

Somente entraram nesta tabela as variáveis que apresentaram correlações significativas ou próximas à significância, com as atividades da BChE.

<sup>o</sup> = valores próximos à significância; IMC = índice de massa corporal; CT = colesterol total; TG = triglicérides; GLC = glicose; Hb = hemoglobina; Hc = hematócrito.

### 5.1.5 Análises de Regressão Múltipla Escalonada das Atividades Absolutas das 13 Bandas da BChE e algumas Variáveis, antes do Uso de HRT

Na TABELA 20 encontram-se os resultados das análises de regressão múltipla escalonada, tendo como dependentes as atividades absolutas das 13 bandas da BChE encontradas em gel de poliacrilamida e como independentes as variáveis analisadas no BioVitae Laboratório. Pode-se observar, que antes do uso de HRT, AB1 correlacionou-se positiva e significativamente com GLC e negativamente com HDL-C. As variáveis incluídas nesse modelo, de acordo com o coeficiente de determinação ( $r^2$ ), responderam por 34% da variação de AB1.

AB1A mostrou-se correlacionada positiva e significativamente somente com T<sub>4</sub>L. A variável incluída nesse modelo, de acordo com o  $r^2$ , respondeu por 11% da variação de AB1A.

AB1B está correlacionada positivamente somente com GLC. De acordo com o  $r^2$  essa variável respondeu por 12% da variação de AB1B.

Dividindo-se AB1A e AB1B pelo valor de suas respectivas medianas (0,041 e 0,047), verifica-se que as mulheres climatéricas com maiores AB1A (N = 27), possuem maiores valores médios de T<sub>4</sub>L ( $p < 0,01$ ), AB1 ( $p < 0,05$ ), AB1B ( $p < 0,00001$ ), AB2 ( $p < 0,0001$ ) e AB3 ( $p < 0,05$ ). As mulheres com maiores AB1B possuem valores maiores de AB1 ( $p < 0,01$ ), AB1A ( $p < 0,00001$ ), AB2 ( $p < 0,0001$ ) e AB3 ( $p < 0,001$ ).

AB2, mostrou-se correlacionada positiva e significativamente com IMC, GLC e negativamente com E<sub>2</sub> e de acordo com o  $r^2$  essas variáveis responderam por 32% de sua variação.

AB3 não demonstrou correlação com nenhuma variável.

AB4 correlacionou-se positiva e significativamente com CT e T<sub>4</sub>L. As variáveis incluídas nesse modelo, de acordo com o  $r^2$  responderam por 28% da variação de AB4.

AB5 mostrou-se correlacionada positiva e significativamente com CT e Hc. As variáveis incluídas nesse modelo, de acordo com o  $r^2$ , respondem por 19% da variação de AB5.

AB6 correlacionou-se positivamente somente com T<sub>3</sub>L. De acordo com o  $r^2$  essa variável respondeu por 10% da variação de AB6.

AB7, mostrou-se correlacionada positiva e significativamente com IMC e CT e negativamente com a idade. De acordo com o  $r^2$  essas variáveis responderam por 31% de sua variação.

AB8 mostrou-se correlacionada positiva e significativamente com T<sub>4</sub>L. A variável incluída nesse modelo, de acordo com o  $r^2$ , responderam por 12% da variação de AB8.

AB9 não demonstrou correlação com nenhuma variável.

AB10, mostrou-se correlacionada positiva e significativamente somente com T<sub>3</sub>L e, de acordo com o  $r^2$  essa variável respondeu por 15% de sua variação.

AB11 mostrou-se correlacionada negativa e significativamente somente com E<sub>2</sub>. A variável incluída nesse modelo, de acordo com o  $r^2$ , respondeu por 8% da variação de AB11.

TABELA 20 - ANÁLISES DE REGRESSÃO MÚLTIPLA ESCALONADA, TENDO AS ATIVIDADES ABSOLUTAS DAS 13 BANDAS DA BCHE COMO DEPENDENTES E COMO INDEPENDENTES ALGUMAS VARIÁVEIS EM AMOSTRAS DE 54 MULHERES CLIMATÉRICAS DE FENÓTIPO CHE2 C5-, ANTES DO USO DE HRT

Variáveis Dependentes	Variáveis independentes									
	Idade	IMC	CT	HDL-C	GLC	Hc	T <sub>3</sub> L	T <sub>4</sub> L	E <sub>2</sub>	$r^2$
AB1	0	0	0	- **	+ ***	0	0	0	0	0,34
AB1A	0	0	0	0	0	0	0	+ *	0	0,11
AB1B	0	0	0	0	+ *	0	0	0	0	0,12
AB2	0	+ *	0	0	+ ***	0	0	0	- *	0,32
AB4	0	0	+ ***	0	0	0	0	+ *	0	0,28
AB5	0	0	+ **	0	0	+ *	0	0	0	0,19
AB6	0	0	0	0	0	0	+ *	0	0	0,10
AB7	- **	+ **	+ **	0	0	0	0	0	0	0,31
AB8	0	0	0	0	0	0	0	+ **	0	0,12
AB10	0	0	0	0	0	0	+ **	0	0	0,15
AB11	0	0	0	0	0	0	0	0	- *	0,08

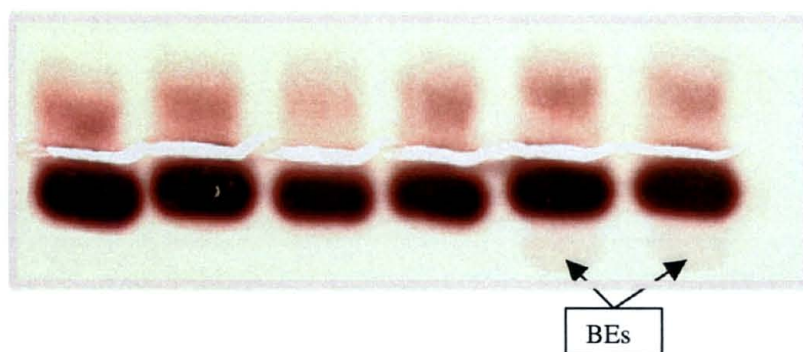
Foram consideradas as variáveis analisadas no Bio Vitae Laboratório como independentes. Só foram incluídas na tabela, as variáveis independentes significativas em pelo menos um modelo. IMC = índice de massa corporal; CT = colesterol total; GLC = glicose; Hc = hematócrito; + = correlação positiva; - = correlação negativa; 0 = variável com resultado não significativo, \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ .



### 5.1.6 Análise de uma Mulher Climatérica que Apresentou Banda Extra na Eletroforese em Gel de Ágar Ácido

Entre as 60 mulheres climatéricas analisadas, uma de fenótipo CHE2 C5– (identificação número 13) apresentou uma banda extra. A frequência desta banda entre elas foi de  $1,67\% \pm 1,65\%$ . A FIGURA 9 contém um fragmento dessa eletroforese, mostrando as bandas extras da primeira e segunda coleta.

FIGURA 9 - FRAGMENTO DE ELETROFORESE EM GEL DE ÁGAR pH 6,5, MOSTRANDO AS BANDAS EXTRAS DAS DUAS (PRIMEIRA E SEGUNDA) COLETAS



### 5.1.7 Comparação das Médias de algumas Variáveis Obtidas antes da HRT de uma Mulher Climatérica, de Fenótipo CHE2 C5– que Apresentou Banda Extra com aquelas de 53 Mulheres Climatéricas, de Fenótipo CHE2 C5–, que não Apresentaram esta Banda

Na TABELA 21 encontram-se os valores das médias (M), teste t e p dos resultados comparativos obtidos entre uma mulher climatérica de fenótipo CHE2 C5– que apresentou banda extra nas eletroforeses em gel de ágar ácido, comparados aos obtidos de 53 mulheres climatéricas de fenótipo CHE2 C5– que não apresentaram essa banda. Só foram incluídos os valores que apresentaram alterações significativas ou próximas à significância.

TABELA 21 - MÉDIAS (M) E RESULTADOS DE TESTES t DE ALGUMAS VARIÁVEIS ANALISADAS, ENTRE UMA MULHER CLIMATÉRICA DE FENÓTIPO CHE2 C5- ANTES DO USO DE HRT, QUE APRESENTOU BANDA EXTRA E 53 MULHERES CLIMATÉRICAS DE FENÓTIPO CHE2 C5- QUE NÃO APRESENTARAM ESTA BANDA

Variáveis	Sem Banda Extra	Banda Extra	t (p)
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	24,02	27,70	1,09 (> 0,20)
CT (mg/dL)	212,00	282,00	1,52 (> 0,10)
HDL-C (mg/dL)	45,57	29,00	1,72 (> 0,05) <sup>♦</sup>
LDL-C (mg/dL)	125,47	217,00	2,24 (< 0,05)
TG (mg/dL)	108,04	258,00	2,84 (< 0,01)
ABChE (kU/L)	5,89	7,18	1,22 (> 0,20)
ARC <sub>4/5</sub> (%)	15,81	20,40	1,44 (> 0,10)
AAC <sub>4/5</sub> (kU/L)	0,94	1,46	1,74 (> 0,05) <sup>♦</sup>

<sup>♦</sup> = valores próximos à significância; IMC = índice de massa corporal; CT = colesterol total; TG = triglicérides.

## 5.2 ANÁLISES DAS MULHERES CLIMATÉRICAS DE FENÓTIPO CHE2 C5-, APÓS O USO DE HRT

Devido ao breve tempo para a realização do Mestrado, não foi possível o retorno de todas as mulheres da amostra inicial (n = 60) para a realização da segunda coleta. Destas, somente 50 retornaram, sendo que 45 delas eram de fenótipo CHE2 C5-.

Têm sido relatados comportamentos diferentes da Tibolona (GODSLAND, 2001; BARNES et al., 2002) quando comparada com o uso de outras formulações utilizadas para HRT frente às seguintes variáveis: CT, TG, LDL-C e HDL-C. Devido a isso, foram realizadas análises de correlações simples das variáveis analisadas no Bio Vitae Laboratório após o uso de HRT total, HRT com Tibolona e HRT sem Tibolona (TABELA 22).

TABELA 22 - ANÁLISES DE CORRELAÇÃO SIMPLES, ENTRE OS NÍVEIS DOS ESTRÓGENOS E ALGUMAS VARIÁVEIS, EM MULHERES CLIMATÉRICAS, ANTES E APÓS O USO DE HRT

Variáveis	Antes da HRT	Após HRT		
	(N = 60)	HRT Total (N = 50)	Sem tibolona (N = 36)	Com Tibolona (N = 14)
Idade	-0,30 (< 0,05)	-0,20 (> 0,10)		
IMC	-0,41 (< 0,001)	-0,18 (> 0,10)		
CT	-0,14 (> 0,30)	-0,20 (> 0,10)	-0,26 (> 0,10)	0,06 (> 0,80)
HDL-C	0,05 (> 0,70)	0,30 (< 0,05)	0,34 (< 0,05)	-0,27 (> 0,30)
LDL-C	-0,12 (> 0,30)	-0,14 (> 0,30)	-0,16 (> 0,30)	0,03 (> 0,90)
TG	-0,16 (> 0,20)	0,19 (> 0,10)	0,19 (> 0,10)	-0,24 (> 0,30)
GLC	-0,21 (> 0,10)	-0,19 (> 0,10)		
TSH	-0,19 (> 0,10)	0,11 (> 0,10)		
T <sub>3</sub> L	-0,21 (> 0,05)	-0,27 (> 0,05) <sup>♦</sup>		
T <sub>4</sub> L	-0,25 (> 0,05) <sup>♦</sup>	-0,18 (> 0,20)		
FSH	-0,53 (< 0,001)	-0,50 (< 0,001)		
Uréia	-0,08 (> 0,50)	-0,16 (> 0,20)		
CREA	-0,25 (> 0,05) <sup>♦</sup>	0,05 (> 0,90)		
Hb	-0,39 (< 0,01)	-0,24 (> 0,05) <sup>♦</sup>		
Hc	-0,35 (< 0,01)	-0,26 (> 0,05) <sup>♦</sup>		

Só foram incluídos na tabela os resultados da Tibolona que demonstraram correlações diferentes das obtidas com HRT sem a Tibolona. <sup>♦</sup> = valores próximos à significância; IMC = índice de massa corporal; CT = colesterol total; TG = triglicérides; GLC = glicose; CREA = creatinina; Hb = hemoglobina; Hc = hematócrito.

### 5.2.1 Comparação das Médias das Variáveis da BChE Analisadas no Presente Estudo, após o Uso de HRT com Aquelas Obtidas antes de seu Uso

Os valores médios obtidos para as variáveis da BChE analisadas na primeira e segunda coleta, com os respectivos desvios padrões, amplitudes de variação e resultados de testes t e p, para as 45 amostras antes e após o uso de HRT, encontram-se na TABELA 23 e a distribuição das médias encontram-se no GRÁFICO 2. Para as análises das variáveis da BChE foram utilizadas também as amostras das mulheres que tomaram Tibolona, uma vez que este hormônio inibe semelhantemente as atividades da BChE.

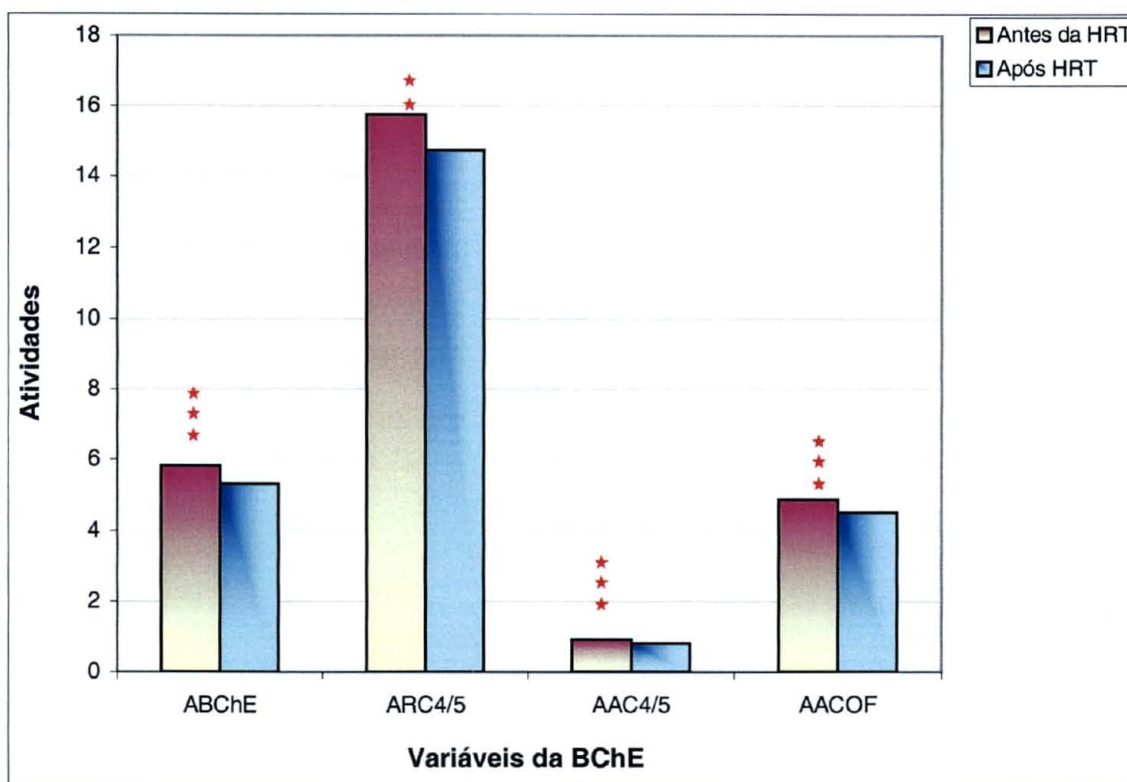
**TABELA 23 - MÉDIAS (M)  $\pm$  DESVIOS PADRÕES (DP) E RESULTADOS DE TESTES t, DAS ATIVIDADES DA BChE EM 45 MULHERES CLIMATÉRICAS DE FENÓTIPO CHE2 C5-, ANTES E APÓS O USO DE HRT**

Variáveis	Antes da HRT	Após HRT	t (p)
	M $\pm$ DP (AV)	M $\pm$ DP (AV)	
ABChE (kU/L)	5,82 $\pm$ 1,00 (3,71 - 8,12)	5,32 $\pm$ 1,09 (3,71 - 7,41)	4,83 (< 0,001)
ARC <sub>4/5</sub> (%)	15,75 $\pm$ 3,33 (7,85 - 21,55)	14,73 $\pm$ 3,70 (9,95 - 21,55)	3,14 (< 0,01)
AAC <sub>4/5</sub> (kU/L)	0,93 $\pm$ 0,30 (0,27 - 1,57)	0,81 $\pm$ 0,32 (0,37 - 1,60)	4,91 (< 0,001)
AAC <sub>OF</sub> (kU/L)	4,89 $\pm$ 0,78 (2,54 - 5,98)	4,51 $\pm$ 0,85 (3,27 - 6,18)	4,41 (< 0,001)

Teste t para amostras dependentes.



**GRÁFICO 2 - REPRESENTAÇÕES ESQUEMÁTICAS DAS ATIVIDADES DA BChE, OBTIDAS EM AMOSTRAS DE 45 MULHERES CLIMATÉRICAS, ANTES E APÓS HRT**



Níveis de significância: \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ .

### 5.2.2 Comparação das Médias de Variáveis Obtidas antes e após do Uso de HRT

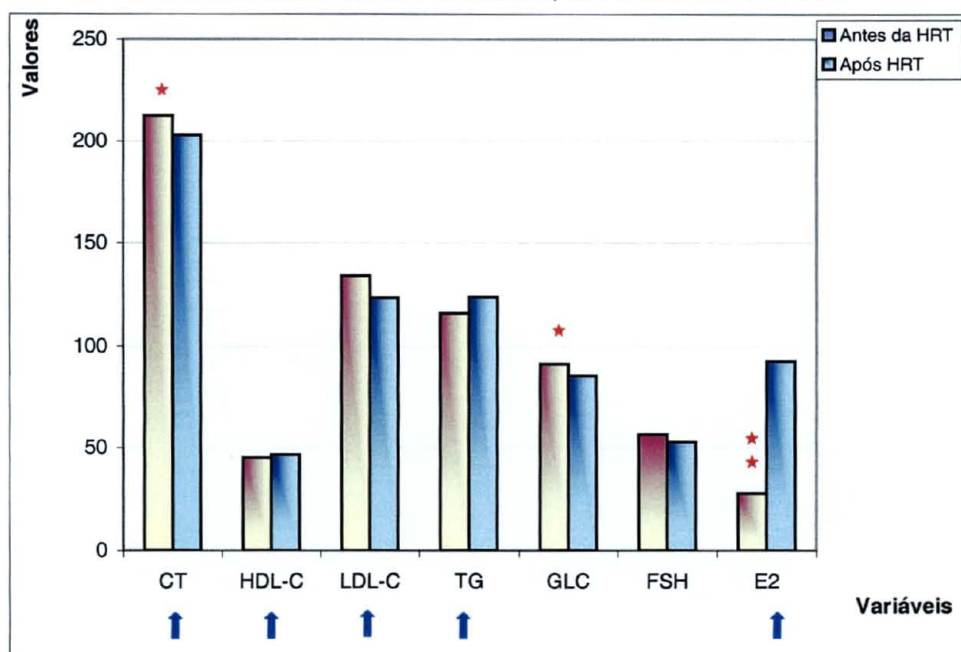
A comparação dos valores médios obtidos para as demais variáveis analisadas na primeira e segunda coleta, com os respectivos desvios padrões, amplitudes de variação e resultados de testes t e p, para as 45 amostras antes e após HRT, encontram-se na TABELA 24. As representações gráficas, das suas médias, estão apresentadas nos GRÁFICOS 3 e 4. Para CT, TG, LDL-C, HDL-C e  $E_2$  foram realizadas duas análises. Uma com a amostra total ( $N = 45$ ) e outra ( $N = 29$ ) retirando-se as amostras das mulheres que tomavam Tibolona, devido ao fato de se observar que estas variáveis mostraram comportamentos diferentes com este hormônio.

TABELA 24 - MÉDIAS (M) ± DESVIOS PADRÕES (DP), AMPLITUDES DE VARIAÇÃO (AV) E RESULTADOS DE TESTES t DE ALGUMAS VARIÁVEIS EM MULHERES CLIMATÉRICAS DE FENÓTIPO CHE2 C5-, ANTES E APÓS O USO DE HRT

Variáveis	Antes da HRT	Após a HRT	t (p)
	M ± DP (AV)	M ± DP (AV)	
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	23,81 ± 3,14 ( 14,95 - 32,42)	23,93 ± 3,30 ( 14,95 - 32,81)	0,61 (> 0,50)
CT (mg/dL)	212,29 ± 46,33 (144,00 - 341,00)	207,33 ± 38,40 (144,00 - 284,00)	0,78 (> 0,40)
CT (mg/dL)	221,71 ± 49,18 (144,00 - 341,00)	204,68 ± 35,88 (159,00 - 284,00)	2,42 (< 0,05)
HDL-C (mg/dL)	45,64 ± 10,20 ( 29,00 - 73,00)	45,53 ± 9,85 ( 31,00 - 69,00)	0,06 (> 0,90)
HDL-C (mg/dL)	44,94 ± 10,64 ( 29,00 - 73,00)	46,45 ± 9,97 ( 31,00 - 69,00)	0,69 (> 0,40)
LDL-C (mg/dL)	127,82 ± 42,68 ( 61,00 - 258,00)	124,80 ± 34,79 ( 60,00 - 205,00)	0,51 (> 0,60)
LDL-C (mg/dL)	134,10 ± 45,93 ( 61,00 - 258,00)	123,55 ± 32,21 ( 60,00 - 190,00)	1,55 (> 0,10)
TG (mg/dL)	111,07 ± 58,44 ( 38,00 - 286,00)	116,04 ± 63,15 ( 54,00 - 371,00)	0,47 (> 0,60)
TG (mg/dL)	115,90 ± 58,89 ( 53,00 - 285,00)	123,68 ± 71,73 ( 54,00 - 371,00)	0,59 (> 0,50)
GLC (mg/dL)	91,22 ± 26,48 ( 68,00 - 225,00)	85,47 ± 16,27 ( 56,00 - 158,00)	2,15 (< 0,05)
TSH (μUI/mL)	2,74 ± 2,76 ( 0,05 - 15,16)	2,97 ± 2,29 ( 0,24 - 11,70)	0,49 (> 0,60)
T <sub>3</sub> L (pmol/L)	4,76 ± 0,57 ( 3,81 - 5,82)	4,31 ± 0,70 ( 2,35 - 6,01)	3,70 (< 0,001)
T <sub>4</sub> L (ng/dL)	0,94 ± 0,16 ( 0,70 - 1,30)	0,89 ± 0,19 ( 0,61 - 1,55)	1,70 (> 0,05) <sup>Φ</sup>
E <sub>2</sub> (pg/mL)	34,45 ± 43,40 ( 9,00 - 194,43)	72,14 ± 118,18 ( 9,00 - 524,53)	2,07 (< 0,05)
E <sub>2</sub> (pg/mL)	27,98 ± 29,83 ( 9,00 - 102,00)	92,42 ± 135,14 ( 9,00 - 524,53)	2,79 (< 0,01)
FSH (mIU/mL)	56,69 ± 31,79 ( 2,56 - 112,00)	52,93 ± 29,96 ( 0,94 - 112,00)	0,84 (> 0,40)
Uréia (mg/dL)	31,67 ± 8,20 ( 12,00 - 49,00)	33,53 ± 7,36 ( 21,00 - 46,00)	1,35 (> 0,10)
CREA (mg/dL)	0,90 ± 0,13 ( 0,70 - 1,20)	0,86 ± 0,13 ( 0,70 - 1,20)	1,80 (> 0,05) <sup>Φ</sup>
Hb (g/dL)	14,04 ± 1,13 ( 10,20 - 16,90)	14,04 ± 0,97 ( 12,20 - 16,40)	0,03 (> 0,90)
Hc (%)	42,44 ± 3,04 ( 34,00 - 51,00)	42,35 ± 2,92 ( 37,00 - 50,00)	0,24 (> 0,80)

Teste t para amostras dependentes. Resultados em preto (N = 45). Resultados em azul, sem as mulheres que tomaram Tibolona (N = 29); <sup>Φ</sup> = valores próximos à significância; IMC = índice de massa corporal; CT = colesterol total; TG = triglicérides; GLC = glicose; CREA = creatinina; Hb = hemoglobina; Hc = hematócrito.

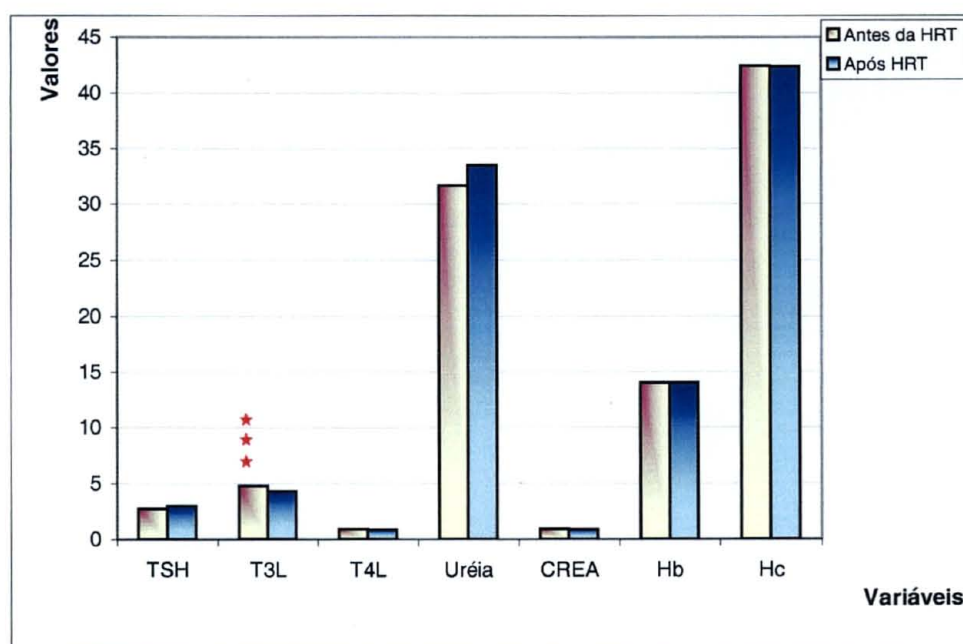
GRÁFICO 3 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE ALGUMAS VARIÁVEIS ANALISADAS NO PRESENTE ESTUDO, NAS AMOSTRAS DE MULHERES CLIMATÉRICAS, ANTES E APÓS HRT



Níveis de significância: \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ .

↑ = análise com a retirada das mulheres que tomaram Tibolona. CT = colesterol; TG = triglicérides; GLC = glicose.

GRÁFICO 4 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE ALGUMAS VARIÁVEIS ANALISADAS NO PRESENTE ESTUDO, NAS AMOSTRAS DE MULHERES CLIMATÉRICAS, ANTES E APÓS HRT



Níveis de significância: \*\*\* =  $p < 0,001$ .

CREA = creatinina; Hb = hemoglobina; Hc = hematócrito.



### 5.2.3 Comparação das Médias de CT, TG, LDL-C, HDL-C e E<sub>2</sub> Obtidas antes e após o Uso de Tibolona

A comparação dos valores médios obtidos para estas variáveis analisadas na primeira e segunda coleta, com os respectivos desvios padrões, amplitudes de variação e resultados de testes t e p, para as 14 amostras de mulheres que fizeram uso de Tibolona, encontram-se na TABELA 25.

**TABELA 25 - MÉDIAS (M)  $\pm$  DESVIOS PADRÕES (DP), AMPLITUDES DE VARIAÇÃO (AV) E RESULTADOS DE TESTES t DE ALGUMAS VARIÁVEIS, EM 14 MULHERES CLIMATÉRICAS DE FENÓTIPO CHE2 C5-, ANTES E APÓS O USO DE TIBOLONA**

Variáveis	Antes da HRT	Após a HRT	t (p)
	M $\pm$ DP (AV)	M $\pm$ DP (AV)	
CT (mg/dL)	191,43 $\pm$ 31,69 (144,00 - 248,00)	213,21 $\pm$ 44,32 (144,00 - 283,00)	2,16 (> 0,05) <sup>Φ</sup>
LDL-C (mg/dL)	113,93 $\pm$ 32,39 ( 71,00 - 167,00)	127,57 $\pm$ 41,11 ( 82,00 - 205,00)	1,31 (> 0,20)
HDL-C (mg/dL)	47,21 $\pm$ 9,32 ( 29,00 - 62,00)	43,50 $\pm$ 9,61 ( 31,00 - 59,00)	1,16 (> 0,20)
TG (mg/dL)	100,36 $\pm$ 58,11 ( 38,00 - 286,00)	99,14 $\pm$ 34,31 ( 62,00 - 169,00)	0,07 (> 0,90)
E <sub>2</sub> (pg/mL)	48,77 $\pm$ 63,26 ( 9,00 - 194,43)	27,23 $\pm$ 44,41 ( 9,00 - 176,08)	0,98 (> 0,30)

Teste t para amostras dependentes. <sup>Φ</sup> = valores próximos à significância; CT = colesterol total; TG = triglicérides.

### 5.2.4 Comparação das Médias das Atividades Absolutas das 13 Bandas da BChE Obtidas, antes e após o Uso de HRT

A comparação dos valores médios obtidos para as atividades absolutas das bandas da BChE obtidas após eletroforese em gel de poliacrilamida, analisadas na primeira e segunda coleta, com os respectivos desvios padrões, amplitudes de variação e resultados de testes t e p, antes e após o uso de HRT, encontram-se na TABELA 26 e as distribuições das médias conforme GRÁFICO 5.



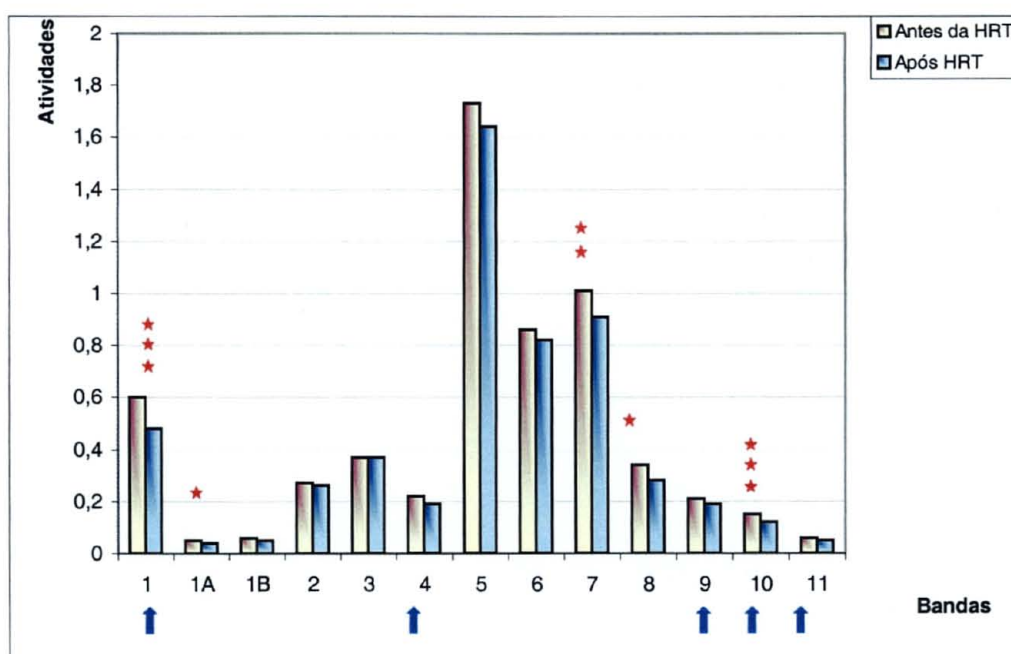
Para AB1, AB4, AB9, AB10 e AB11 foram realizadas 3 análises. Uma com a amostra total (N = 41), outra se retirando as amostras das mulheres que tomavam Tibolona (N = 29) e por fim uma com as amostras das mulheres que fizeram uso da Tibolona (N = 14), devido ao fato de se observar que estas frações da BChE mostravam comportamentos diferentes com este hormônio.

TABELA 26 - MÉDIAS (M)  $\pm$  DESVIOS PADRÕES (DP), AMPLITUDES DE VARIAÇÃO (AV) E RESULTADOS DE TESTES t DAS ATIVIDADES TOTAIS (kU/L) DAS 13 BANDAS DA BChE OBTIDAS EM MULHERES CLIMATÉRICAS DE FENÓTIPO CHE2 C5-, ANTES E APÓS O USO DE HRT

Variáveis	Antes da HRT				Após a HRT				t (p)
	M ± DP (AV)				M ± DP (AV)				
AB1	0,56 ±	0,25 (	0,09 -	1,33)	0,49 ±	0,19 (	0,17 -	0,99)	2,11 (< 0,05)
AB1	0,60 ±	0,26 (	0,18 -	1,33)	0,48 ±	0,19 (	0,17 -	0,99)	3,68 (< 0,001)
AB1	0,46 ±	0,19 (	0,09 -	0,79)	0,52 ±	0,19 (	0,28 -	0,91)	0,90 (> 0,30)
AB1A	0,05 ±	0,04 (	0,00 -	0,15)	0,04 ±	0,03 (	0,00 -	0,10)	2,22 (< 0,05)
AB1B	0,06 ±	0,04 (	0,00 -	0,17)	0,05 ±	0,04 (	0,00 -	0,14)	1,40 (> 0,10)
AB2	0,27 ±	0,11 (	0,01 -	0,48)	0,26 ±	0,12 (	0,02 -	0,59)	1,37 (> 0,10)
AB3	0,37 ±	0,13 (	0,10 -	0,59)	0,37 ±	0,10 (	0,11 -	0,57)	0,27 (> 0,70)
AB4	0,20 ±	0,08 (	0,06 -	0,48)	0,19 ±	0,07 (	0,07 -	0,32)	1,62 (> 0,10)
AB4	0,22 ±	0,08 (	0,12 -	0,48)	0,19 ±	0,07 (	0,09 -	0,32)	1,99 (> 0,05)⁹
AB4	0,17 ±	0,07 (	0,06 -	0,27)	0,17 ±	0,06 (	0,07 -	0,31)	0,12 (> 0,90)
AB5	1,73 ±	0,39 (	1,08 -	3,04)	1,64 ±	0,38 (	0,91 -	2,50)	1,63 (> 0,10)
AB6	0,86 ±	0,28 (	0,49 -	1,93)	0,82 ±	0,29 (	0,36 -	1,79)	1,02 (> 0,30)
AB7	1,00 ±	0,23 (	0,71 -	1,51)	0,91 ±	0,28 (	0,40 -	1,64)	2,83 (< 0,01)
AB8	0,34 ±	0,20 (	0,01 -	1,02)	0,28 ±	0,15 (	0,08 -	0,81)	2,36 (< 0,05)
AB9	0,19 ±	0,10 (	0,00 -	0,54)	0,19 ±	0,10 (	0,07 -	0,50)	0,01 (> 0,90)
AB9	0,21 ±	0,10 (	0,00 -	0,54)	0,19 ±	0,09 (	0,07 -	0,43)	1,33 (> 0,10)
AB9	0,14 ±	0,06 (	0,03 -	0,25)	0,20 ±	0,13 (	0,09 -	0,50)	2,40 (< 0,05)
AB10	0,14 ±	0,07 (	0,00 -	0,35)	0,12 ±	0,07 (	0,02 -	0,37)	2,49 (< 0,05)
AB10	0,15 ±	0,07 (	0,01 -	0,35)	0,12 ±	0,08 (	0,03 -	0,37)	4,28 (< 0,001)
AB10	0,12 ±	0,06 (	0,03 -	0,24)	0,13 ±	0,05 (	0,07 -	0,21)	1,18 (> 0,20)
AB11	0,06 ±	0,04 (	0,01 -	0,16)	0,05 ±	0,03 (	0,00 -	0,13)	1,23 (> 0,20)
AB11	0,06 ±	0,04 (	0,01 -	0,16)	0,05 ±	0,03 (	0,00 -	0,12)	1,98 (> 0,05)⁹
AB11	0,06 ±	0,04 (	0,02 -	0,13)	0,07 ±	0,03 (	0,02 -	0,13)	0,90 (> 0,30)

Resultados em preto (N = 41). Resultados em azul, somente com as mulheres que não tomaram Tibolona (N = 29). Resultados em verde somente com as mulheres que tomaram Tibolona (N = 12).

GRÁFICO 5 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS ATIVIDADES DAS 13 BANDAS QUE APARECERAM NAS AMOSTRAS DE MULHERES CLIMATÉRICAS, EM GEL DE POLIACRILAMIDA, ANTES E APÓS HRT



Níveis de significância: \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ;  
 ↑ = análise com a retirada das mulheres que tomaram Tibolona;  
 \* = valores próximos à significância.

### 5.2.5 Resultados das Análises de Correlação Simples, entre as Atividades da BChE e algumas Variáveis, após o uso de HRT

Na TABELA 27 e 28, encontram-se os resultados de correlação simples (amostra total, N = 45 e amostra sem Tibolona, N = 29, respectivamente) entre a atividade total da BChE (ABChE), a atividade relativa do complexo C<sub>4/5</sub> (ARC<sub>4/5</sub>), atividade absoluta do complexo C<sub>4/5</sub> (AAC<sub>4/5</sub>) e atividade absoluta das outras formas moleculares (AAC<sub>OF</sub>), com os demais parâmetros estudados, destacando-se em vermelho, as variáveis que apresentaram coeficientes de correlação diferentes de zero.

TABELA 27 - RESULTADOS DAS ANÁLISES DE CORRELAÇÃO SIMPLES, ENTRE AS ATIVIDADES DA BChE E AS DEMAIS VARIÁVEIS, EM 45 MULHERES MENOPAUSADAS DE FENÓTIPO CHE2 C5-, APÓS O USO DE HRT

Variáveis	ABChE (p)	ARC <sub>4/5</sub> (p)	AAC <sub>4/5</sub> (p)	AAC <sub>OF</sub> (p)
Idade	0,24 (> 0,10)	0,04 (> 0,70)	0,12 (> 0,40)	0,27 (> 0,05) <sup>o</sup>
IMC	0,45 (< 0,01)	0,21 (> 0,10)	0,35 (< 0,05)	0,45 (< 0,01)
CT	0,31 (< 0,05)	0,25 (> 0,05) <sup>o</sup>	0,32 (< 0,05)	0,29 (> 0,05) <sup>o</sup>
HDL-C	-0,34 (< 0,05)	-0,26 (> 0,05) <sup>o</sup>	-0,34 (< 0,05)	-0,31 (< 0,05)
LDL-C	0,33 (< 0,05)	0,26 (> 0,05) <sup>o</sup>	0,33 (< 0,05)	0,30 (< 0,05)
TG	0,18 (> 0,20)	0,10 (> 0,50)	0,19 (> 0,20)	0,17 (> 0,20)
GLC	0,39 (< 0,01)	0,03 (> 0,80)	0,18 (> 0,20)	0,43 (< 0,01)
T <sub>3</sub> L	0,32 (< 0,05)	0,44 (< 0,01)	0,42 (< 0,01)	0,27 (> 0,05) <sup>o</sup>
T <sub>4</sub> L	0,35 (< 0,05)	0,26 (> 0,05) <sup>o</sup>	0,34 (< 0,05)	0,32 (< 0,05)
E <sub>2</sub>	-0,50 (< 0,001)	-0,33 (< 0,05)	-0,42 (< 0,01)	-0,50 (= 0,001)
FSH	0,32 (< 0,05)	0,34 (< 0,05)	0,32 (< 0,05)	0,29 (> 0,05) <sup>o</sup>
Uréia	0,21 (> 0,10)	-0,07 (> 0,60)	0,08 (> 0,60)	0,25 (> 0,05) <sup>o</sup>
Hb	0,35 (< 0,05)	0,31 (< 0,05)	0,37 (< 0,05)	0,31 (< 0,05)
Hc	0,43 (< 0,01)	0,35 (< 0,05)	0,45 (< 0,01)	0,39 (< 0,01)

<sup>o</sup> = Valores próximos à significância. ; IMC = índice de massa corporal; CT = colesterol total; TG = triglicérides; GLC = glicose; Hb = hemoglobina; Hc = hematócrito.



TABELA 28 - RESULTADOS DAS ANÁLISES DE CORRELAÇÃO SIMPLES, ENTRE AS ATIVIDADES DA BChE E AS DEMAIS VARIÁVEIS, EM 31 MULHERES MENOPAUSADAS DE FENÓTIPO CHE2 C5-, APÓS HRT SEM O USO DE TIBOLONA

Variáveis	ABChE (p)	ARC <sub>4/5</sub> (p)	AAC <sub>4/5</sub> (p)	AAC <sub>OF</sub> (p)
IMC	0,40 (< 0,05)	0,18 (> 0,30) <sup>º</sup>	0,33 (> 0,05) <sup>º</sup>	0,39 (< 0,05)
CT	0,36 (< 0,05)	0,11 (> 0,50)	0,27 (> 0,10)	0,37 (< 0,05)
HDL-C	-0,39 (< 0,05)	-0,25 (> 0,10)	-0,36 (< 0,05)	-0,37 (< 0,05)
LDL-C	0,39 (< 0,05)	0,07 (> 0,70)	0,25 (> 0,10)	0,41 (< 0,05)
GLC	0,36 (< 0,05)	0,09 (> 0,60)	0,23 (> 0,20)	0,38 (< 0,05)
T <sub>3</sub> L	0,41 (< 0,05)	0,22 (> 0,20)	0,32 (> 0,05) <sup>º</sup>	0,41 (< 0,05)
T <sub>4</sub> L	0,35 (< 0,05)	0,26 (> 0,05) <sup>º</sup>	0,34 (< 0,05)	0,32 (< 0,05)
E <sub>2</sub>	-0,56 (= 0,001)	-0,42 (< 0,05)	-0,51 (< 0,01)	-0,53 (< 0,01)
Hc	0,40 (< 0,05)	0,17 (> 0,30)	0,29 (> 0,10)	0,41 (< 0,05)

Somente entraram nesta tabela as variáveis que apresentaram correlações significativas ou próximas à significância, em pelo menos um modelo. <sup>º</sup> = Valores próximos à significância. IMC = índice de massa corporal; CT = colesterol; GLC = glicose; Hc = hematócrito.

## 5.2.6 Resultados das Análises de Regressão Múltipla Escalonada em Obtidos de Amostras de Mulheres Climatéricas, após Uso de HRT, sem Tibolona

Nestas análises (TABELA 29) foram incluídas a amostra com 31 mulheres que não fizeram uso de Tibolona. Nesta tabela encontram-se os resultados das análises de regressão múltipla escalonada, tendo como dependentes as variáveis ABChE, ARC<sub>4/5</sub>, AAC<sub>4/5</sub> e AAC<sub>OF</sub> e como independentes as variáveis analisadas no Bio Vitae Laboratório. Pode-se observar, que após do uso de HRT (amostras sem Tibolona), ABChE correlacionou-se significativamente com TG (+) e com E<sub>2</sub> (-). As variáveis incluídas nesse modelo, de acordo com o coeficiente de determinação ( $r^2$ ) respondem por 43% da variação de ABChE.

ARC<sub>4/5</sub> mostrou-se correlacionada negativa e significativamente somente com E<sub>2</sub>. A variável incluída nesse modelo, de acordo com o  $r^2$ , respondeu por 15% da variação de ARC<sub>4/5</sub>.

AAC<sub>4/5</sub> está correlacionada significativamente com TG (+) e E<sub>2</sub> (-). De acordo com o  $r^2$  essas variáveis responderam por 40% da variação de AAC<sub>4/5</sub>.

Quanto a AAC<sub>OF</sub>, mostrou-se correlacionada positiva e significativamente com IMC, LDL-C e T<sub>4</sub>L e negativamente com idade e E<sub>2</sub>. De acordo com o  $r^2$  essas variáveis respondem por 63% de sua variação.

**TABELA 29 - ANÁLISES DE REGRESSÃO MÚLTIPLA ESCALONADA, TENDO AS VARIÁVEIS DA BChE COMO DEPENDENTES, EM AMOSTRAS DE 31 MULHERES CLIMATÉRICAS DE FENÓTIPO CHE2 C5-, APÓS O USO DE HRT SEM TIBOLONA**

VD	Variáveis independentes						$r^2$
	IDADE	IMC	LDL-C	TG	T <sub>4</sub> L	E <sub>2</sub>	
ABChE	0	0	0	+ *	0	- ***	0,43
ARC <sub>4/5</sub>	0	0	0	0	0	- *	0,15
AAC <sub>4/5</sub>	0	0	0	+ **	0	- ***	0,40
AAC <sub>OF</sub>	- *	+ *	+ **	0	+ **	- *	0,63

Foram consideradas as variáveis analisadas no Bio Vitae Laboratório como independentes. Encontram-se incluídas na tabela, somente as variáveis significativas em pelo menos um modelo. VD = variáveis independentes; IMC = índice de massa corporal; TG = triglicérides; + = correlação positiva; - = correlação negativa; 0 = variável com resultado não significativo.

\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ .

### 5.2.7 Resultados das Análises de Correlação Simples das 13 Bandas da BChE e Algumas Variáveis, Obtidas em Amostras de 29 Mulheres Climáticas após o Uso de HRT sem uso de Tibolona

Na TABELA 30 não estão incluídas as mulheres que utilizaram Tibolona, uma vez que foi verificado que este hormônio além de afetar o perfil lipídico, afeta também as atividades de algumas bandas da BChE.

TABELA 30 - CORRELAÇÕES SIMPLES ENTRE AS ATIVIDADES DAS 13 BANDAS DA BChE E ALGUMAS VARIÁVEIS, OBTIDAS EM AMOSTRAS DE 29 MULHERES CLIMATÉRICAS DE FENÓTIPOS CHE2 C5-, APÓS O USO DE HRT SEM TIBOLONA

Variáveis	AB1 (p)	AB1A (p)	AB1B (p)	AB2 (p)	AB3 (p)	AB4 (p)
IMC	0,37 (= 0,05)			0,33 (> 0,05)		
HDL-C	-0,43 (< 0,05)		-0,35 (> 0,05) <sup>φ</sup>			
TG		0,41 (< 0,05)				
GLC	0,55 (< 0,01)		0,37 (< 0,05)	0,46 (< 0,05)	0,37 (= 0,05)	
TSH					0,34 (> 0,05) <sup>φ</sup>	
T <sub>4</sub> L			0,48 (< 0,01)	0,40 (< 0,05)	0,36 (> 0,05) <sup>φ</sup>	
E <sub>2</sub>						-0,39 (< 0,05)
Uréia	0,38 (< 0,05)					
Variáveis	AB5 (p)	AB7 (p)	AB8 (p)	AB9 (p)	AB10 (p)	AB11 (p)
IMC		0,44 (< 0,05)	0,45 (< 0,05)			
CT		0,49 (< 0,01)	0,56 (= 0,001)	0,45 (< 0,05)		0,38 (< 0,05)
LDL-C		0,47 (= 0,01)	0,43 (< 0,05)	0,53 (< 0,01)	0,34(> 0,05) <sup>φ</sup>	0,53 (< 0,01)
TG		0,55 (< 0,01)	0,40 (< 0,05)			
GLC			0,43 (< 0,05)			
Uréia			0,44 (< 0,05)			
E <sub>2</sub>	-0,56 (< 0,01)	-0,35 (> 0,05) <sup>φ</sup>				
Hc	0,35 (>0,05) <sup>φ</sup>	0,34 (> 0,05) <sup>φ</sup>				

— Somente entraram nesta tabela as variáveis que apresentaram correlações significativas ou próximas à significância com as atividades da BChE; <sup>φ</sup> = valores próximos à significância; TG = triglicérides, GLC = glicose; Hc = hematócrito.

### 5.2.8 Resultados das Análises de Regressão Múltipla Escalonada Obtidos de Amostras de 29 Mulheres Climatéricas após o Uso de HRT sem uso de Tibolona

Na TABELA 31 encontram-se os resultados das análises de regressão múltipla escalonada, tendo como dependentes as atividades absolutas das 13 bandas da BChE encontradas em gel de poliacrilamida e como independentes as variáveis analisadas no BioVitae Laboratório. Não estão incluídas as mulheres que utilizaram Tibolona, pelo motivo exposto no item 5.2.7. Pode-se observar, que após do uso de HRT, AB1 correlacionou-se positiva e significativamente com GLC e negativamente com HDL-C. As variáveis incluídas nesse modelo, de acordo com o coeficiente de determinação ( $r^2$ ), responderam por 51% da variação de AB1.

AB1A mostrou-se correlacionada positiva e significativamente somente com TG. A variável incluída nesse modelo, de acordo com o  $r^2$ , respondeu por 17% da variação de AB1A.

AB1B e AB2 correlacionaram-se positiva e significativamente com GLC e  $T_4L$ . De acordo com o  $r^2$  essas variáveis responderam por 34% da variação de AB1B e 34% da variação de AB2..

AB3 correlacionou-se positiva e significativamente somente com GLC. A variável incluída nesse modelo, de acordo com o  $r^2$ , respondeu por 14% da variação de AB3.

AB4 e AB5 correlacionaram-se negativa e significativamente  $E_2$ . A variável incluída nesse modelo, de acordo com o  $r^2$  respondeu por 15 e 32%, da variação de AB4 e AB5, respectivamente.

AB6 não apresentou correlação com nenhuma variável.

AB7, mostrou-se correlacionada positiva e significativamente com IMC, CT, TG e  $T_4L$  e negativamente com a idade e  $E_2$ . De acordo com o  $r^2$  essas variáveis responderam por 75% de sua variação.

AB8 mostrou-se correlacionada positiva e significativamente com IMC e CT. As variáveis incluídas nesse modelo, de acordo com o  $r^2$ , responderam por 48% da variação de AB8.

AB9 mostrou-se correlacionada positiva e significativamente com LDL-C e  $T_4L$ . De acordo com o  $r^2$  essas variáveis responderam por 42% de sua variação.

AB10, não apresentou correlação com nenhuma variável.



AB11 mostrou-se correlacionada positiva e significativamente somente com LDL-C. A variável incluída nesse modelo, de acordo com o  $r^2$ , respondeu por 28% da variação de AB11.

TABELA 31 - ANÁLISES DE REGRESSÃO MÚLTIPLA ESCALONADA, TENDO AS ATIVIDADES DAS 13 BANDAS DA BChE COMO DEPENDENTES E COMO INDEPENDENTES AS DEMAIS VARIÁVEIS OBTIDAS, EM AMOSTRA DE 29 MULHERES CLIMATÉRICAS DE FENÓTIPO CHE2 C5-, APÓS USO DE HRT SEM TIBOLONA

VD	Variáveis independentes									
	Idade	IMC	CT	HDL-C	LDL-C	TG	GLC	T <sub>4</sub> L	E <sub>2</sub>	r <sup>2</sup>
AB1	0	0	0	- **	0	0	+ ***	0	0	0,51
AB1A	0	0	0	0	0	+ *	0	0	0	0,17
AB1B	0	0	0	0	0	0	+ *	+ **	0	0,34
AB2	0	0	0	0	0	0	+ *	+ *	0	0,34
AB3	0	0	0	0	0	0	+ *	0	0	0,14
AB4	0	0	0	0	0	0	0	0	- *	0,15
AB5	0	0	0	0	0	0	0	0	- **	0,32
AB7	- **	+ **	+ **	0	0	+ **	0	+ *	- *	0,75
AB8	0	+ **	+ ***	0	0	0	0	0	0	0,48
AB9	0	0	0	0	+ ***	0	0	+ *	0	0,42
AB11	0	0	0	0	+ **	0	0	0	0	0,28

VD = variáveis dependentes. Somente entraram nesta tabela as variáveis que apresentaram correlação com as atividades da BChE. IMC = índice de massa corporal; CT = colesterol total; TG = triglicérides; GLC = glicose.  $\phi$  = valores próximos à significância.

\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ .

### 5.3 ANÁLISES DAS MULHERES CLIMATÉRICAS DE FENÓTIPO CHE2 C5+, ANTES E APÓS O USO DE HRT

Devido ao pequeno número de mulheres com este fenótipo só foram realizadas algumas análises.



### 5.3.1 Comparação das Médias das Variáveis Analisadas entre os Fenótipos CHE2 C5– e CHE2 C5+ antes do Uso de HRT

Na TABELA 32 encontram-se as comparações das médias de algumas variáveis analisadas no presente estudo nas 54 mulheres de fenótipo CHE2 C5– e nas 6 CHE2 C5+.

### 5.3.2 Valores da ABChE e $ARC_5$ nas Mulheres Climatéricas antes e após HRT

Estes resultados encontram-se na TABELA 33. Esses resultados dizem respeito apenas a 5 mulheres desse fenótipo que retornaram para recoleta.

### 5.3.3 Análises de Correlação Simples das Mulheres Climatéricas de Fenótipo CHE2 C5+ antes e após o Uso de HRT

As correlações significativas, ou mais próximas à significância, de  $ARC_5$  com as demais variáveis analisadas feitas com as 6 mulheres de fenótipo CHE2 C5+ e com as 5 mulheres que voltaram para recoleta, encontram-se na TABELA 34.

ABChE não mostrou correlação significativa com nenhuma variável analisada, portanto, não foram apresentados estes resultados.

No GRÁFICO 6 encontram-se representadas as correlações mais significativas da  $ARC_5$ , antes (A) e após (B) o uso de HRT.

TABELA 32 - MÉDIAS (M)  $\pm$  DESVIOS PADRÕES (DP), AMPLITUDES DE VARIAÇÃO (AV) E RESULTADOS DE TESTES t DE ALGUMAS VARIÁVEIS EM 54 MULHERES CLIMATÉRICAS DE FENÓTIPO CHE2 C5- E 6 DE FENÓTIPO CHE2 C5+ ANTES DO USO DE HRT

Variáveis	CHE2 C5-	CHE2 C5+	t (p)
	M $\pm$ DP (AV)	M $\pm$ DP (AV)	
CT (mg/dL)	213,52 $\pm$ 46,01 (144,00 - 341,00)	264,00 $\pm$ 75,67 (191,00 - 364,00)	2,38 (< 0,05)
GLC (mg/dL)	90,87 $\pm$ 24,57 ( 68,00 - 225,00)	79,33 $\pm$ 7,50 ( 71,00 - 91,00)	1,14 (> 0,20)
T <sub>3</sub> L (ng/dL)	4,74 $\pm$ 0,53 ( 3,81 - 5,82)	4,11 $\pm$ 0,56 ( 3,55 - 5,05)	2,71 (< 0,05)
T <sub>4</sub> L (ng/dL)	0,94 $\pm$ 0,15 ( 0,70 - 1,30)	0,87 $\pm$ 0,17 ( 0,61 - 1,11)	1,09 (> 0,20)
FSH (mIU/mL)	57,64 $\pm$ 8,01 ( 2,56 - 112,00)	74,37 $\pm$ 5,09 ( 8,99 - 111,00)	1,21 (> 0,20)
CREA (mg/dL)	0,90 $\pm$ 0,12 ( 0,70 - 1,20)	0,83 $\pm$ 0,05 ( 0,80 - 0,90)	1,29 (> 0,20)

CT = colesterol total; GLC = glicose; CREA = creatinina. Das variáveis analisadas, só entraram as que obtiveram resultados significativos ou  $p < 0,25$ .

TABELA 33 - MÉDIAS (M)  $\pm$  DESVIOS PADRÕES (DP), AMPLITUDES DE VARIAÇÃO (AV) E RESULTADOS DE TESTES t DA ABChE E ARC<sub>5</sub> EM 5 MULHERES CLIMATÉRICAS DE FENÓTIPO CHE2 C5+, ANTES E APÓS O USO DE HRT

Variáveis	Antes da HRT	Após HRT	t (p)
	M $\pm$ DP (AV)	M $\pm$ DP (AV)	
ABChE (KU/L)	6,14 $\pm$ 1,10 (3,71 - 8,12)	5,92 $\pm$ 0,78 (3,71 - 7,41)	0,90 (> 0,40)
ARC <sub>5</sub> (%)	37,57 $\pm$ 2,03 (7,85 - 21,55)	36,53 $\pm$ 3,00 (9,95 - 21,55)	1,39 (> 0,20)

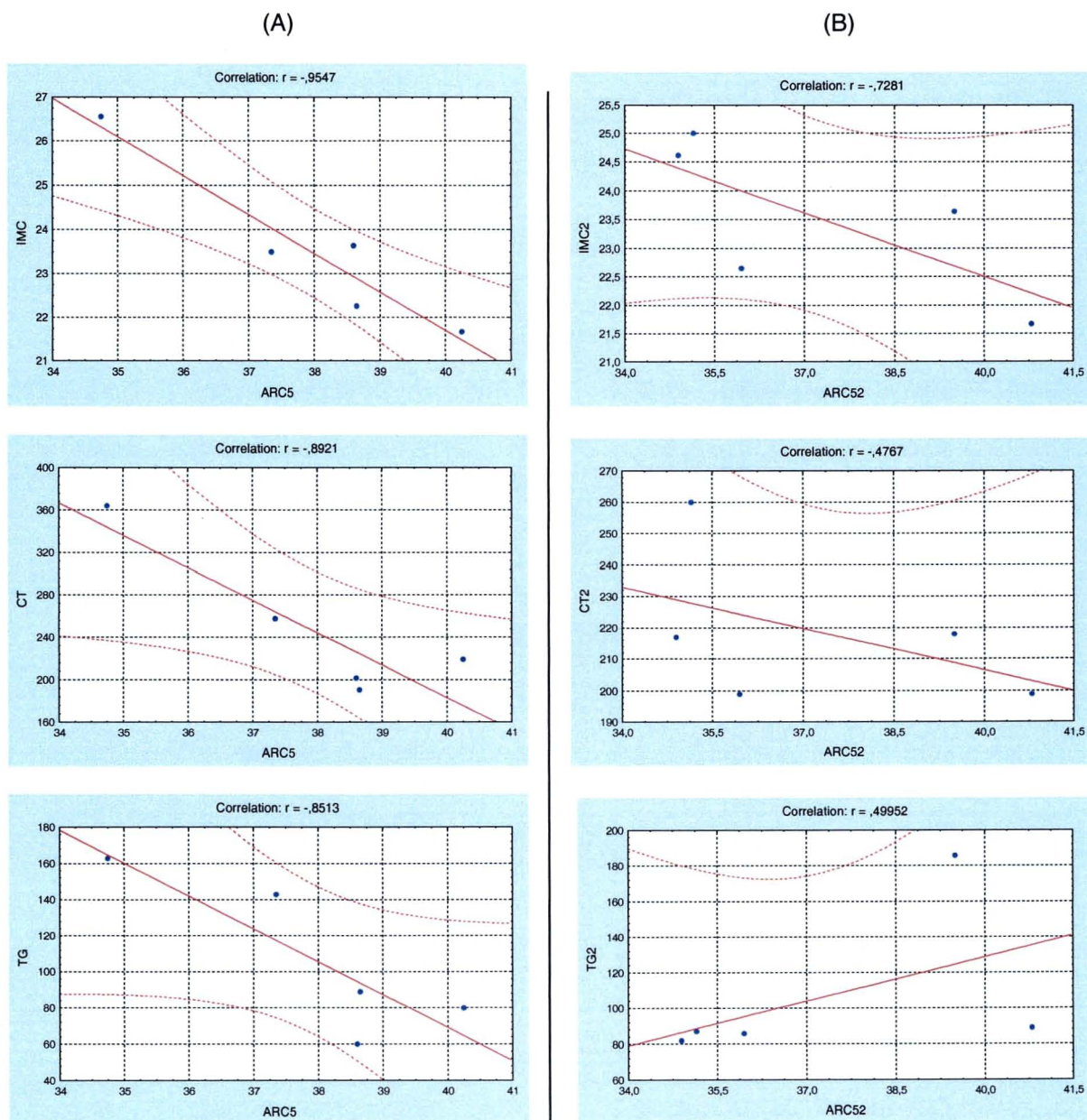
TABELA 34 - ANÁLISES DE CORRELAÇÃO SIMPLES, ENTRE ARC<sub>5</sub> COM ALGUMAS VARIÁVEIS EM MULHERES CLIMATÉRICAS DE FENÓTIPO CHE2 C5+, ANTES E APÓS A HRT\*

Variáveis	Antes da HRT (N = 6)	Antes da HRT (N = 5)	Após HRT (N = 5)
	ARC <sub>5</sub> (p)	ARC <sub>5</sub> (p)	ARC <sub>5</sub> (p)
IMC	-0,95 (< 0,01)	-0,95 (< 0,05)	-0,73 (> 0,10)
CT	-0,91 (< 0,05)	-0,89 (< 0,05)	-0,48 (> 0,40)
TG	-0,87 (< 0,05)	-0,85 (> 0,05)*	0,50 (> 0,30)

Só entraram na tabela as correlações significativas ou mais próximas à significância.

IMC = índice de massa corporal; CT = colesterol total; TG = triglicérides; \* = sem uso de Tibolona.

GRÁFICO 6 - ILUSTRAÇÃO DAS CORRELAÇÕES DE ARC<sub>5</sub> COM IMC, CT E TG EM MULHERES CLIMATÉRICAS DE FENÓTIPO CHE2 C5+, ANTES (A) E APÓS (B) O USO DE HRT



IMC = índice de massa corporal; CT = colesterol total; TG = triglicérides.

## 6 DISCUSSÃO

Antes da análise dos resultados, é conveniente salientar que as razões que levaram a população feminina desta pesquisa a procurar orientação médica, assim como os motivos que levaram os clínicos a recomendarem as HRT são desconhecidos.

São imprevisíveis, tanto o tempo quanto o aparecimento ou não dos sintomas e a gravidade dos mesmos, em cada mulher (JOHNSON, 1997). Na maioria das vezes, o desconforto causado pelos sintomas vasomotores, relacionados à falência ovariana é que levam as mulheres ao consultório médico (GREENDALE; SOWERS, 1997; JOHNSON, 1997; NAMS, 2003). No entanto, é sabido que não só alterações físicas aparecem, mas também alterações psicológicas em diferentes graus de intensidade (ROZENBERG et al., 1998). A tentativa de reverter estes e outros sintomas clínicos ou psicológicos é que vão justificar o uso da HRT (JOHNSON, 1997; LOPES, 1998; STEVENSON; WITHEHEAD, 2002; NAMS, 2003).

Da amostra do presente trabalho, composta por 60 mulheres climatéricas, seis apresentaram fenótipo CHE2 C5+. A frequência desse fenótipo foi de  $10,0\% \pm 3,9\%$ , a qual mostrou estar em acordo ( $\chi^2 = 0,02$  e  $p > 0,80$ ) com aquela encontrada por CHAUTARD-FREIRE-MAIA et al. (1991), na população geral de Curitiba ( $N = 2541$ ;  $10,50\% \pm 0,62\%$ ).

### 6.1 ANÁLISE DAS 54 MULHERES CLIMATÉRICAS DE FENÓTIPO CHE2 C5-, ANTES DO USO DE HRT

#### 6.1.1 Análises Descritivas de Algumas Variáveis Analisadas no Presente Trabalho antes da HRT

Mulheres no período de pré-menopausa têm baixas incidências de doença arterial coronariana (DAC) em comparação com homens da mesma idade, resultado

em parte pela presença do estradiol endógeno, que parece ter importante efeito cardioprotetor graças à sua provável ação anti-aterogênica e cardio-dilatadora. A incidência de DAC em mulheres de 35 a 44 anos é de aproximadamente 1:1000, de 45 a 54 anos essa incidência aumenta para 4:1000. Após os 50 anos, idade em que a maioria das mulheres já se encontra em período de climatério, a incidência de DAC começa a aumentar, chegando a níveis de 50% da incidência no homem. A partir dos 60 anos, essa incidência iguala-se entre homens e mulheres (SOTELO; JOHNSON, 1997).

DALLONGEVILLE et al. (1995) estudando 2000 mulheres com idade entre 45 e 65 anos, que não faziam uso de HRT, verificaram que as mulheres climatéricas em comparação com as pré-menopausadas tinham maiores níveis de CT e TG. MATTHEWS et al. (1994) mostraram a diminuição do HDL-C e aumento da LDL-C após a menopausa.

MARTINEZ et al. (1997) relatam que o maior risco de DAC em idosos talvez possa estar relacionado aos aumentos nos níveis de LDL-C, CT e TG, acompanhados da diminuição dos níveis de HDL-C.

Conforme os dados do item 5.1.1 e da TABELA 15, pode-se verificar, que mulheres de fenótipo CHE2 C5- apresentaram resultados acima dos valores de referência para: ABChE,  $ARC_{4/5}$ ,  $AAC_{4/5}$ ,  $AAC_{OF}$ , IMC, CT, TG, LDL-C, GLC, TSH, FSH, Hb, Hc e  $E_2$ . Foram também encontrados valores diminuídos para  $E_2$ , HDL-C, TSH, Hc e Hb. Valores elevados de FSH e diminuídos de  $E_2$  caracterizam o esperado para a comprovação de falência ovariana (LOPES, 1998; ACOG - *EDUCATIONAL BULLETIN*, 1998; NAMS, 2003). No item 5.1.1, encontram-se as freqüências de valores aumentados ou diminuídos para estas variáveis.

Aumentos da ABChE na menopausa já foram citados por diversos autores (REDDERSON, 1973; FAIRBROTHER, et al., 1988; FULLER; BERGER, 1990).

Segundo a ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA PARA O ESTUDO DA OBESIDADE (ABESO, 2003), um IMC de 25 a 29,9 kg/m<sup>2</sup> indica sobrepeso. Há divergências quanto à causa de ganho de peso no período de climatério. Alguns autores relacionam o aumento de gordura à redução de atividade ovariana (SORENSEN et al., 2001), mas homens e mulheres tendem a ganhar tecido adiposo com o processo de aumento da idade, o que sugere que o ganho possa estar associado à idade e não especificamente a redução do  $E_2$  (*THE JEAN HAILES FOUNDATION*, 2000;

BLUMEL et al., 2001) ou a outros fatores, como o aumento da interleucina-6 com a idade, que poderia estar relacionada com o aumento do tecido adiposo (MANTOVANI et al., 2003). Os dados encontrados neste trabalho para IMC, assemelham-se aos dados publicados no MJA (2002), que constatou um IMC maior ou igual a 25 kg/m<sup>2</sup> para mais da metade das mulheres com 45 anos.

Aumentos nos níveis de CT, LDL-C, TG e diminuições nos de HDL-C, após o climatério, já estão bem estabelecidos (VAN BAAL; KOOISTRA; STEHOUWER, 2000; ALCÂNTARA et al., 2002; MARTINEZ et al., 2003).

De acordo com CARR; GRIFFIN (1998), mulheres climatéricas estão mais sujeitas a apresentarem Síndrome Metabólica por possuírem obesidade abdominal, perfil lipídico aterogênico, caracterizado por aumento nos níveis de LDL-C (principalmente das LDL pequenas e densas, atribuídas ao aumento do IMC), TG, GLC, insulina e com redução da HDL-C.

DORMIRE; REAME (2003) mostraram que a incidência de calorões, comuns no climatério, pode estar relacionada a níveis mais baixos de GLC em jejum (níveis < 110 mg/dL), pois a incidência destes calorões diminuiu com a elevação experimental da GLC sanguínea (130 - 140 mg/dL).

O aumento de TSH no climatério já havia sido observado (SCHINDLER, 2003), tendo repetido-se no presente estudo. Entretanto, alterações nos níveis médios de T<sub>3</sub>L e T<sub>4</sub>L ainda não tinham sido observados, embora haja relatos tanto de hipo como hipertireoidismo no climatério.

Os aumentos nos índices de Hc também foram encontrados por HINDERLITER et al. (2002), quando analisavam amostras de pacientes climatéricas. Embora os aumentos na concentração da Hb sejam esperados devido aos aumentos de Hc, BULPITT et al. (1994) relatam aumentos da concentração de Hb com a idade.

Não foram observadas alterações nos níveis médios de uréia e CREA, indicando que as mulheres analisadas não apresentaram anormalidades renais.

### 6.1.2 Análises de Correlação Simples entre as Atividades da BChE e algumas Variáveis Analisadas antes do Uso de HRT

Serão comentados no presente item os resultados referentes à TABELA 16.

Resultados divergentes têm sido obtidos com relação ao papel da idade sobre a ABChE. CALLAWAY; DAVIES; RUTLAND (1951) e VORHAUS; KARK (1953) relatam não haver influência da idade, entretanto, efeitos positivos da idade foram relatados por CHAUTARD-FREIRE-MAIA (1989); CROOK; HAQ; TUTT (1994) e ALCÂNTARA (2000). Esses resultados conflitantes podem ser devido às diferentes faixas etárias e outras variáveis analisadas nos diferentes trabalhos, levando à alteração das correlações com idade. A flutuação de valores de ABChE é relativamente pequena, porque os valores permanecem constantes em cada indivíduo em condições normais, por longos períodos de tempo (HOSENFELD; SCHRÖTER, 1970). FAIRBROTHER et al. (1988) e ABOU-HATAB et al. (2001) relatam valores de ABChE maiores em mulheres a partir dos 36 anos. No presente trabalho, nenhuma correlação com idade e ABChE foi verificada. Isso parece ser um efeito do climatério, por exemplo, a mulher mais jovem (38 anos) que participou desse estudo, possui uma atividade maior que 7,0 kU/L, possivelmente pela presença de alterações metabólicas que a fizeram procurar um médico e fazer uso da HRT.

Neste trabalho, a ABChE mostrou correlação positiva com IMC, CT, LDL-C e TG e negativa com HDL-C. Estes resultados apóiam trabalhos que sugerem o envolvimento da BChE no metabolismo de lípidos e lipoproteínas (LAWRENCE; MELNICK, 1961; CUCUIANU et al., 1975; SHIRAI et al., 1985; ABBOTT et al., 1993; KUTTY; PAYNE, 1994; ALCÂNTARA et al., 2002; ALCÂNTARA et al., 2003b). SHIRAI et al. (1985) haviam sugerido que a BChE poderia estar envolvida no metabolismo de lipoproteínas, facilitando o transporte do CT da VLDL ou IDL para o LDL-C.

Valores de ABChE maiores com relação ao aumento de IMC também foram obtidos por ALCÂNTARA et al. (2003b), evidenciando uma maior ABChE em obesos de fenótipo CHE C5-, do que seus controles pareados em sexo, idade e altura. Correlações positivas também foram evidenciadas por CUCUIANU et al. (1975); CHU et al. (1978); CHAUTARD-FREIRE-MAIA et al. (1991); ALCÂNTARA et al.



(2003a). WHITTAKER (1986) relatou aumentos da ABChE em pacientes que eram obesos ou apresentavam diabetes mellitus (DM), hipertireoidismo ou hiperlipemias. Já foram mostradas correlações positivas de ABChE com: TG (MAGARIAN; DIETZ, 1987), CT (MAGARIAN; DIETZ, 1987; ALCÂNTARA et al., 2002), VLDL-C e LDL-C (CUCUIANU et al., 1975; CHU et al., 1978; MAGARIAN; DIETZ, 1987) e de correlações negativas com HDL-C (MAGARIAN; DIETZ, 1987). Diferentes hipóteses para a correlação negativa com HDL-C têm sido propostas, como inibição da ABChE pelo HDL-C (KUTTY et al., 1981) ou apenas ligação física entre a enzima e as frações do CT (MAGARIAN; DIETZ, 1987).

Na TABELA 16 observa-se correlação positiva da ABChE com a GLC. Aumento de ABChE em diabetes têm sido descritas por vários autores (ANTOPOL; TUCHMAN; SCHIFRIN, 1937; PATEL et al., 1990; ANNAPURNA et al., 1991; ORESKOVIC; KUNEC-VAJIC, 1992; PAVKOVIC et al., 1993; ALCÂNTARA et al., 2002).

As correlações negativas da ABChE com  $E_2$  foram mostradas por ALCÂNTARA (2000). A correlação negativa e significativa com o  $E_2$  pode estar associada à depressão da síntese hepática de algumas enzimas, entre elas a BChE, pelos hormônios esteróides. Isso justifica também os achados de valores de atividade mais altos em homens do que em mulheres da mesma idade (FULLER; BERGER, 1990) e diferentes valores de ABChE nas mulheres em diferentes estados de maturação sexual, estando diminuídos na menarca, no uso de contraceptivos, gravidez, pós-parto e aumentados significativamente nos estados de transição da menopausa e pós-menopausa (REDDERSON, 1973; FAIRBROTHER, et al., 1988; FULLER; BERGER, 1990).

As correlações positivas da ABChE com Hb e Hc podem ser resultantes do papel sugerido da BChE na hematopoiese (EHRlich et al., 1994; PATINKIN et al., 1994).

Uréia e CREA não apresentaram relação com ABChE. O mesmo já havia sido observado por ALCÂNTARA (2000) e ALCÂNTARA et al. (2003b), estudando obesos e não obesos de fenótipo CHE2 C5-.

Embora haja um grande número de trabalhos relatando o aumento ou diminuição da ABChE no soro em diferentes alterações metabólicas, pouca literatura há a respeito do complexo  $C_{4/5}$ . A primeira referência de separação do complexo  $C_{4/5}$



é de SOUZA (1995). Na literatura, apenas trabalhos de ALCÂNTARA (2000); ALCÂNTARA et al. (2003a) e ALCÂNTARA et al. (2003b) relatam quantificações dessa fração. Não existe nenhum trabalho envolvendo HRT e a quantificação desse complexo, sendo este o primeiro.

A  $ARC_{4/5}$  mostrou correlação negativa e significativa com HDL-C, sugerindo ser própria das mulheres climatéricas, uma vez que ALCÂNTARA (2000) não encontrou correlação do HDL-C com  $ARC_{4/5}$  em obesos e não obesos, de fenótipo CHE2 C5– na população de Curitiba, PR.

Correlações positivas de ABChE,  $AAC_{4/5}$  e  $AAC_{OF}$  com CT, TG, GLC,  $T_3$  e  $T_4$  e negativa com  $E_2$ , semelhantes às encontradas nas mulheres climatéricas do presente estudo, já foram demonstradas por ALCÂNTARA (2000) e ALCÂNTARA et al. (2003b) em pacientes obesos e não obesos. Também foram encontradas correlações positivas e significativas de  $AAC_{OF}$  com IMC.

Correlações positivas encontradas no presente estudo de  $AAC_{OF}$  com Hb e Hc, não possuem dados comparativos por não terem sido realizadas anteriormente em nenhum outro trabalho.

As correlações de ABChE e  $AAC_{OF}$  são muito semelhantes, uma vez que  $AAC_{OF}$  compreende a maior parte da enzima.

### 6.1.3 Análises de Regressão Múltipla Escalonada, antes do Uso de HRT

Na TABELA 18, quando foram consideradas a ABChE,  $ARC_{4/5}$   $AAC_{4/5}$  e  $AAC_{OF}$  como variáveis dependentes e como variáveis independentes, aquelas analisadas no Bio Vitae Laboratório, a ABChE correlacionou-se positiva e significativamente com CT e Hb e negativa e significativamente com HDL-C, mostrando que essas são as variáveis mais correlacionadas com a ABChE de todas as que haviam apresentado correlações na TABELA 16. As demais variáveis não entraram no modelo devido suas correlações com aquelas que fizeram parte do modelo (TABELA 17). Por exemplo: correlações do IMC com Hb, do LDL-C com CT, e da GLC com IMC.

$ARC_{4/5}$  demonstrou correlação somente com HDL-C (–) de maneira similar a correlação simples.

AAC<sub>4/5</sub> correlacionou-se positiva e significativamente com CT e T<sub>4</sub>L, e negativa e significativamente com HDL-C, deixando de se correlacionar com as demais variáveis (TABELA 16) devido à relação entre elas.

AAC<sub>OF</sub> correlacionou-se positiva e significativamente com IMC, CT e Hc, deixando de se correlacionar com as outras variáveis (TABELA 16).

Todas as variáveis da BChE tiveram suas variações explicadas em mais que 28%, com exceção da ARC<sub>4/5</sub>.

A falta de correlação negativa, na análise de regressão múltipla, entre ABChE e E<sub>2</sub> pode ser explicada pelas altas correlações da ABChE com CT e Hb (TABELA 16).

#### 6.1.4 Análises de Correlação Simples entre as Atividades Absolutas das 13 Bandas da BChE e algumas Variáveis, antes do Uso de HRT

Na TABELA 19 pode-se observar todas as correlações que obtiveram significância ou que se encontraram próximas à significância, entre as atividades das 13 bandas da BChE obtidas em gel de poliacrilamida e as variáveis analisadas no Bio Vitae Laboratório em mulheres climatéricas. Esses resultados serão discutidos juntamente com os da TABELA 20.

#### 6.1.5 Análises de Regressão Múltipla Escalonada entre as Atividades Absolutas das 13 Bandas da BChE e algumas Variáveis, antes da HRT

Na TABELA 20 pode-se observar as variáveis independentes que foram significativamente mais importantes para cada uma das atividades das 13 bandas da BChE obtidas em eletroforese de poliacrilamida, antes da HRT.

AB1 correlacionou-se positivamente com GLC e negativamente com HDL-C. Hc e Hb que haviam mostrado correlações nas análises de correlações simples, deixaram de se correlacionar, possivelmente por apresentarem altas correlações com GLC (TABELA 17).

AB1A correlacionou-se positivamente com  $T_4L$ , mostrando que esta é a variável mais importante para esta fração, nas mulheres climatéricas. Esta banda apareceu com alta frequência (89%) entre as mulheres climatéricas. AB1B correlacionou-se positivamente apenas com GLC, de forma similar à correlação simples, observada na TABELA 19. Esta banda também apareceu com alta frequência em mulheres climatéricas (94%). Estas duas bandas vêm sendo observadas também em pacientes diabéticos do tipo II (dados ainda não publicados), sugerindo que possa haver alguma semelhança metabólica entre esses dois grupos (mulheres climatéricas e os diabéticos tipo II).

AB2 correlacionou-se positivamente com IMC e GLC e negativamente com  $E_2$ . O IMC não havia se correlacionado anteriormente (TABELA 19). Isso mostrou, que nessas mulheres, após terem sido controlados os níveis de GLC e  $E_2$ , o IMC passou a se correlacionar com AB2 positivamente.

AB3 não demonstrou correlação com nenhuma das variáveis.

AB4 correlacionou-se positivamente com CT e  $T_4L$ , perdendo as correlações com idade, LDL-C e  $E_2$  (TABELA 19).

AB5 correlacionou-se positivamente com CT e Hc, desaparecendo as correlações com LDL-C e TG (TABELA 19).

AB6 correlacionou-se positivamente com  $T_3L$ , desaparecendo a correlação anterior da uréia (TABELA 19).

AB7 correlacionou-se positivamente com IMC, CT e negativamente com idade. A idade que não havia se correlacionado anteriormente (TABELA 19), mas mostrou que depois de controlados o IMC e os níveis de CT, passou a apresentar significância. Assim, nas mulheres climatéricas com valores de IMC e CT semelhantes, aquelas com menor idade possuem maior atividade da AB7.

AB8 correlacionou-se positivamente com  $T_4L$  de maneira semelhante à TABELA 19.

AB9 não demonstrou correlação com nenhuma das variáveis.

AB10 correlacionou-se positivamente com  $T_3L$ , deixando de se correlacionar com o CT (TABELA 19). Correlações negativas entre os hormônios da tireóide e CT já estão bem estabelecidas (BRAUNWALD et al., 2001).

AB11 mostrou correlação negativa com  $E_2$ , igual à apresentada na TABELA 19.

Resumindo-se: as atividades médias das diversas frações da BChE estão correlacionadas com diferentes variáveis (bioquímicas, idade, IMC). Assim, antes da HRT, observam-se correlações de:

IMC (+), com AB2 e AB7; CT (+) com AB4, AB5 e AB7; HDL-C (–) com AB1; GLC (+) AB1, AB1B e AB2; T<sub>4</sub>L (+) com AB1A, AB4 e AB8; E<sub>2</sub> (–) com AB2 e B11 e Hc (+) com AB5.

#### 6.1.6 Análise de uma Mulher Climatérica que Apresentou Banda Extra na Eletroforese em Gel de Ágar Ácido

A frequência da banda extra, encontrada nas mulheres climatéricas desta pesquisa foi de  $1,67\% \pm 1,65\%$ , não diferindo ( $\chi^2 = 0,06$ ;  $p > 0,80$ ) da frequência encontrada por ALCÂNTARA (2000) que foi de  $2,20\% \pm 1,09\%$ . A referida autora, encontrou quatro bandas com características semelhantes às encontradas no presente trabalho, em gel de ágar ácido, porém, diferentes em gel de poliacrilamida, de pacientes obesos (N = 182). Na população geral de Curitiba, PR, essa banda foi encontrada com frequência de  $0,25\% \pm 0,14\%$  (N = 1206), não diferindo também da encontrada no presente estudo ( $\chi^2 = 2,59$ ;  $p > 0,10$ ).

#### 6.1.7 Comparação das Médias de algumas Variáveis Obtidas antes da HRT de uma Mulher Climatérica, de Fenótipo CHE2 C5– que Apresentou Banda Extra com aquelas de 53 Mulheres Climatéricas, de Fenótipo CHE2 C5–, que não Apresentaram esta Banda

Observando-se a TABELA 21, pode-se verificar que essa mulher, quando comparadas as médias de suas variáveis com as médias das demais, apresentou médias mais elevadas para: LDL-C e TG. Os resultados encontrados são semelhantes aos encontrados por ALCÂNTARA (2000) para duas das amostras de obesos que apresentaram banda extra com mesmo perfil eletroforético, em gel de ágar ácido, da encontrada nesta pesquisa.

A referida pesquisadora sugeriu que a banda extra pudesse estar associada com a obesidade ou com algum fator a ela relacionado. Talvez essa banda possa estar também relacionada à morbididade das alterações dos níveis lipídicos.

## 6.2 ANÁLISES DAS MULHERES DE FENÓTIPO CHE2 C5–, APÓS USO DE HRT

Na TABELA 22 pode-se verificar que os níveis de estrógenos obtidos com o uso de Tibolona não se correlacionam significativamente nem com o CT nem com o LDL-C, e se correlaciona negativa, apesar de não significativamente, com HDL-C e TG. Embora a amostra de mulheres utilizando Tibolona seja pequena ( $N = 14$ ), resultados semelhantes aos encontrados já haviam sido relatados por GOLDSLAND (2001) e BARNES et al. (2002).

### 6.2.1 Médias das Variáveis da BChE Analisadas no Presente Estudo, antes do Uso de HRT com aquelas Obtidas após seu Uso

Alguns autores determinaram haver alteração, após o uso de formulações contendo hormônios, na atividade da BChE depois do 21º dia de uso (WHITTAKER; CHARLIER; RAMASWAMY, 1971) e alterações nos níveis de algumas enzimas a partir da segunda semana de uso (CALIC; STRAUS; CEPELAK, 1989). Segundo CALIC; STRAUS; CEPELAK (1989), esses valores ficam estáveis após dois meses de uso do composto, o que nos leva a crer que os níveis das variáveis, alcançados após o período de uso de HRT, pelas mulheres da presente pesquisa estão bem estabelecidos.

Para essa análise, foram considerados os resultados obtidos das 45 mulheres de fenótipo CHE2 C5– que retornaram para a coleta, após HRT, independente do protocolo de HRT utilizado, embora as reduções da ABChE e AAC<sub>OF</sub> tenham sido mais expressivas sem o uso de Tibolona. O uso de diferentes formulações contendo E<sub>2</sub> e progesterona não acarretam diferenças significativas nos resultados das

atividades da BChE (WHITTAKER; CHARLIER; RAMASWAMY, 1971; REDDERSON, 1973).

Podemos observar na TABELA 23 e GRÁFICO 2, que após o uso de HRT a ABChE, AAC<sub>4/5</sub>, ARC<sub>4/5</sub> e AAC<sub>OF</sub> apresentaram reduções significativas em suas médias. A redução da ABChE já era esperada. Razões para essa redução têm sido propostas por diferentes pesquisadores sem que, no entanto, haja consenso. ROBERTSON (1967); HAZEL; MONIER (1971); REDDERSON (1973); SIDDEL; KAMINSKIS (1975) atribuíram a redução da ABChE à diminuição da síntese hepática da enzima; MASSOULIÉ et al. (1993), às mudanças na expressão e distribuição da enzima; REDDERSON (1973), à inibição da enzima no soro ou à produção de enzima anormal e LUINE; HARDING; BLEISCH (1983); FAIRBROTHER et al. (1988) à influência do hormônio na modulação (produção ou degradação) da enzima. Apesar das diferentes hipóteses, podemos concluir que, de alguma forma, o hormônio vai diminuir a atividade da enzima. Não haviam sido ainda, analisadas a ação da HRT sobre as diferentes bandas da BChE obtidas em gel de ágar ou gel de poliacrilamida.

#### 6.2.2 Comparação das Médias das Variáveis Obtidas antes do Uso de HRT, com aquelas Obtidas após seu Uso

Observando-se a TABELA 24, pode-se verificar que não houve alterações significativas nas médias do IMC. Segundo ANDERSON et al. (2001) e SORENSEN et al. (2001), não há alterações de peso com uso de HRT.

O CT mostrou média significativamente menor após HRT com a retirada da Tibolona das análises. O LDL-C também apresentou média aparentemente menor, entretanto não significativa, talvez devido à diminuição do número da amostra com a retirada da Tibolona (N = 31).

A média de TG após HRT mostrou uma tendência a maior valor, após a retirada da Tibolona. Revisões de VAN BAAL; KOOISTRA; STEHOUWER (2000) e ALCÂNTARA et al. (2002) citam reduções de CT e LDL-C assim como, aumentos de TG e HDL-C em mulheres pós-menopausadas após uso de HRT (não considerando Tibolona).

Houve diminuição significativa nos valores médios da GLC. Diminuições de GLC em jejum após HRT foram demonstradas por LOKE et al. (1992).

De acordo com SCHINDLER (2003) existe uma prevalência de aumentos de TSH com o aumento da idade, particularmente na pós-menopausa. A incidência das doenças de tireóide na população climatérica é a seguinte: cerca de 2,4% apresentam doença clínica e 23,2% apresentam doença subclínica. Do grupo que apresenta doença subclínica, 73,8% são hipo e 26,2% são hipertireoidianas. Antes da HRT, algumas mulheres da presente pesquisa já haviam apresentado valores aumentos de TSH (5,6%, item 5.1.1), indicando doença subclínica. Após a HRT, a média de TSH aumentou levemente e as de  $T_3L$  ( $< 0,001$ ) e  $T_4L$  ( $> 0,05$ ) diminuíram, reforçando uma tendência ao hipotireoidismo (TABELA 24). De acordo com esse mesmo autor, só a HRT não é suficiente para controlar a doença, havendo necessidade de complementação com tiroxina.

Uréia apresentou valores levemente aumentados, sem diferença significativa. WIEDEMANN; SCHWARTZ (1972) relatam aumento de uréia após HRT e citam que este aumento reflete o efeito anabólico dos estrógenos.

A CREA apresentou redução nos seus valores próximos ao índice de significância. WALDEN et al. (1986) observaram aumentos de CREA em mulheres que utilizaram contraceptivos orais com predominância de progestógenos em suas formulações e reduções, naqueles que utilizaram contraceptivos com predomínio de estrógenos, sugerindo um efeito competitivo entre os dois hormônios. Entre os hormônios utilizados nesta pesquisa, existe predominância de  $E_2$ , portanto, nossos dados concordam com o referido autor.

Hc e Hb não mostraram alterações de seus valores quando comparados antes e após HRT. LOKE et al. (1992) também não relataram alterações dessas variáveis com o uso de  $E_2$ .

### 6.2.3 Comparações Entre as Médias de CT, TG, LDL-C, HDL-C e E<sub>2</sub> antes e após o Uso de Tibolona

Quando se analisam as médias dos lípides, antes e após o uso de Tibolona (TABELA 25), pode-se notar que CT e LDL-C apresentaram médias maiores, enquanto HDL-C, TG e E<sub>2</sub> diminuíram. Entretanto os valores não deram significativos podendo ser devido ao pequeno número da amostra (N = 14). Vários trabalhos relacionam a diminuição nos níveis de HDL-C e TG com o uso de Tibolona (GODSLAND, 2001; BARNES et al., 2002). A redução dos níveis de E<sub>2</sub>, diferentemente do esperado, deve-se provavelmente à não bioreatividade da Tibolona com a metodologia utilizada para a quantificação do E<sub>2</sub>.

De acordo com VON ECKARDSTEIN et al. (2003), a Tibolona diminui o HDL-C em parte por aumentar a atividade da lipase hepática.

Num artigo publicado em PRESCRIBE INTERNATIONAL (2002) sem autores listados, o efeito androgênico da Tibolona tem efeito desfavorável por diminuir HDL-C. Também de acordo com o artigo, a Tibolona possui um efeito positivo sobre a densidade óssea, mas efeitos subseqüentes sobre o risco de fraturas têm sido escassamente avaliados. Isso sugere que a Tibolona não possui vantagens sobre as outras combinações de estrógenos e progesterona. O presente trabalho corrobora essa sugestão.

### 6.2.4 Comparação das Médias das Atividades Absolutas das 13 Bandas da BChE Obtidas antes e após o Uso de HRT

Foram comparadas as atividades das diferentes bandas da BChE, obtidas após eletroforese em gel de poliacrilamida, inclusive das duas (AB1A e AB1B) que apareceram com alta frequência nas mulheres climatéricas (TABELA 26 e GRÁFICO 5). Algumas mostraram diferenças com o uso de Tibolona e foram analisadas separadamente.

AB1 (monômero) mostrou diminuição significativa em suas atividades médias na amostra total, aumentando a significância quando desconsiderada a Tibolona.



Quando apenas a Tibolona foi considerada, não houve aumento significativo nas médias.

AB1A diminuiu significativamente sua atividade média após HRT, independente da formulação utilizada.

AB7 teve suas atividades médias diminuídas significativamente após o uso de HRT, independente do hormônio utilizado.

AB8 teve redução significativa de seus valores médios de atividade, independente do uso ou não da Tibolona nas análises.

AB9, quando consideradas apenas as amostras de HRT total os valores permaneceram inalterados. Sem Tibolona, os valores reduziram mas não significativamente. Mas, para os resultados dos valores médios obtidos apenas com o uso de Tibolona, houve um aumento significativo na média da atividade dessa fração.

AB10 quando consideradas todas as HRTs, houve redução significativa das médias. Essa significância torna-se ainda maior quando se retira a Tibolona da análise. Considerando-se apenas a Tibolona, houve um aumento não significativo na atividade média da fração.

AB11 apresentou redução próxima à significância quando desconsiderado o uso de Tibolona.

Resumindo, o uso de Tibolona, diferentemente das outras HRTs utilizadas, fez aumentar a atividade da fração B9. A diminuição na ABChE após HRT, deve-se primariamente à diminuição na atividade das seguintes frações: B1, B1A, B7, B8 e B10 (TABELA 26).

#### 6.2.5 Análises de Correlação Simples, entre as Atividades da BChE e algumas Variáveis, após o Uso de HRT

Foram realizadas tabelas de correlações após o uso de HRT com e sem Tibolona pelo fato de se observar que este hormônio afeta o perfil lipídico.

Após o uso de HRT (com e sem o uso de Tibolona, TABELAS 27 e 28, respectivamente) ABChE, AAC<sub>4/5</sub> e AAC<sub>OF</sub> perderam suas correlações positivas e

significativas com os níveis médios de TG, sugerindo que a produção de TG possa não estar vinculada a estas variáveis da BChE, após o uso de HRT.

RANDELL; ROGERS e SMITH (2001) estimularam a produção de BChE e TG utilizando células de adenocarcinoma intestinal humano (CACO 2). As respostas, ao estímulo de produção com oleato, causaram aumentos na concentração TG, mas não houve aumento na atividade da enzima; ao mesmo tempo, quando do uso de insulina, houve aumento na produção de BChE sem aumentar a produção de TG. Isso sugeriu que a produção de ácidos graxos e a atividade da BChE ocorrem por mecanismos independentes.

#### 6.2.6 Análises de Regressão Múltipla Escalonada em Amostras de Mulheres Climatéricas, após Uso de HRT, sem Uso de Tibolona

Após a HRT, as correlações das variáveis da BChE (TABELA 29) se alteraram quando comparadas com dados da TABELA 18 (antes da HRT), mantendo-se apenas a correlação do IMC com  $AC_{OF}$ . Todas as variáveis passaram a apresentar correlações significativas com o  $E_2$ .

É interessante observar que o TG que não havia apresentado correlações nas análises de correlação simples (TABELAS 27 e 28), passou a correlacionar-se com ABChE e  $AAC_{4/5}$  após controlados os níveis de  $E_2$ , o que não mostra a independência total da BChE e TG.

A idade, IMC, LDL-C,  $T_4L$  e  $E_2$  foram os responsáveis por 63% da alteração ocorrida na fração  $AAC_{OF}$ .

#### 6.2.7 Análises de Correlação Simples Entre as Atividades das 13 Bandas da BChE e algumas Variáveis Analisadas, Obtidas em Amostras de 29 Mulheres Climatéricas após o Uso de HRT sem Uso de Tibolona

Os resultados da TABELA 30 serão discutidos juntamente com os resultados das análises de regressão múltipla (item 6.2.8).

### 6.2.8 Análises de Regressão Múltipla Escalonada em Amostra de 29 Mulheres Climatéricas após o Uso de HRT sem Uso de Tibolona

Após HRT (TABELA 31), sem o uso de Tibolona, somente a AB1 não mudou suas correlações quando comparadas com as obtidas antes da HRT. As variáveis independentes que entraram nos modelos foram praticamente as mesmas (com exceção de TG, LDL-C, T<sub>3</sub>L e Hc), só mudando as bandas às quais estavam correlacionadas.

As variáveis AB1, AB7, AB8 e AB9 foram as que tiveram suas variações melhor explicadas.

Resumindo-se: as atividades médias das diversas frações da BChE estão correlacionadas com diferentes variáveis (bioquímico-hormonais, idade, IMC). Assim, após HRT (desconsiderando-se a amostra de mulheres que tomaram Tibolona), observa-se correlações de: idade (–) com AB7; IMC e CT (+) com AB7 e AB8; HDL-C (–) com AB1; LDL-C (+) com AB9 e AB11; TG (+) com AB1A e AB7; GLC (+) com AB1, AB1B, AB2 e AB3; T<sub>4</sub>L (+) com AB1B, AB2, AB7, e AB9, E<sub>2</sub> (–) com AB4, AB5 e AB7.

Estes resultados sugerem que as correlações das atividades médias das diferentes frações da BChE dependem das alterações metabólicas que ocorrem no organismo após o uso de HRT.

## 6.3 ANÁLISES DAS 6 MULHERES CLIMATÉRICAS DE FENÓTIPO CHE2 C5+, ANTES E APÓS USO DE HRT

### 6.3.1 Comparação das Médias das Variáveis Analisadas entre os Fenótipos CHE2 C5– e CHE2 C5+

As mulheres climatéricas de fenótipo CHE2 C5+ mostraram menores valores médios de T<sub>3</sub>L (TABELA 32), entretanto CT mostrou média maior naquelas de fenótipo CHE2 C5+. ABChE no fenótipo CHE2 C5+ parece não se alterar com

modificações metabólicas no organismo. ALCÂNTARA et al. (2003b) também não observaram diferenças entre ABChE de obesos CHE2 C5+ e CHE2 C5—.

### 6.3.2 Comparação das Médias da ABChE e ARC<sub>5</sub> antes e após Uso de HRT

Na TABELA 33 observa-se que a ABChE e ARC<sub>5</sub> não apresentaram diminuições significativas após HRT (nenhuma das mulheres utilizando Tibolona).

### 6.3.3 Análises de Correlação Simples entre as Atividades da BChE e ARC<sub>5</sub> com as demais Variáveis, em 6 Mulheres Climatéricas de Fenótipo CHE2 C5+, antes e após o Uso de HRT

Em mulheres climatéricas de fenótipo CHE2 C5+ (TABELA 34), ARC<sub>5</sub> correlacionou-se negativa e significativamente com IMC, CT e TG. Antes da HRT. Esses dados estão ilustrados no GRÁFICO 6. De acordo com estes resultados, a mulher climatérica, com CT de 364,0 mg/dL (TABELA 32), deve possuir banda C<sub>5</sub> de intensidade fraca (ARC<sub>5</sub> fraca). Este resultado pode ser verificado no GRÁFICO 6A (ARC<sub>5</sub> x CT).

Correlações de ARC<sub>5</sub> com o IMC já foram encontradas anteriormente em vários trabalhos (ALCÂNTARA, 2000; ALCÂNTARA et al., 2001; ALCÂNTARA et al., 2003b). Entretanto as demais correlações ainda não haviam sido verificadas anteriormente.

Devido à pequena amostra (N = 5), precisam ser refeitas essas análises com uma amostra maior para confirmação dos resultados.

No GRÁFICO 6 é possível observar que as correlações de ARC<sub>5</sub> com IMC e CT obtidas antes da HRT foram mais intensas do que aquelas resultantes das análises após HRT. A correlação com TG tendeu a positividade. Se esse fato for comprovado com maior amostra, TG aumenta mais, após HRT, nas mulheres que possuem C<sub>5</sub> forte.

## 7 CONCLUSÕES

1) Todas as atividades da BChE (Total,  $ARC_{4/5}$ ,  $AAC_{4/5}$  e  $AAC_{OF}$ ) diminuíram significativamente após o uso de HRT nas 45 mulheres climatéricas.

2) Essa diminuição parece ser devida à diminuição significativa das bandas AB1, AB1A, AB7, AB8 e AB10. Essas bandas representam cerca de 36% da atividade total da BChE.

3) AB9 aumentou significativamente com o uso de Tibolona. Essa banda representa cerca de 3% da atividade total da BChE.

4) Antes da HRT, a maioria das mulheres apresentava valores acima dos de referência para CT (57,4%), LDL-C (72,2%), FSH (83,3%) e abaixo dos valores de referência para  $E_2$  (79,6%).

5) Após HRT houve redução significativa nos níveis de CT ( $p < 0,05$ ), GLC ( $p < 0,05$ ) e  $T_3L$  ( $p < 0,01$ ) e aumentos de  $E_2$  ( $p < 0,01$ ), sem considerar o uso de Tibolona.

6) Antes da HRT, a ABChE,  $ARC_{4/5}$ ,  $AAC_{4/5}$  e  $AAC_{OF}$  apresentavam correlações com CT (+), HDL-C (-), IMC (+),  $T_4L$  (+), Hb (+) e Hc (+).

7) Após a HRT a ABChE,  $ARC_{4/5}$ ,  $AAC_{4/5}$  e  $AAC_{OF}$  apresentavam correlações com IMC (+), LDL-C (+), TG (+),  $T_4L$  (+) e  $E_2$  (-), com coeficientes de correlação mais altos do que os apresentados antes da HRT.

8) Antes da HRT a correlação das variáveis da BChE (TABELA 18), deve-se à correlação de: IMC (+) com AB7; CT (+) com AB4, AB5 e AB7; HDL-C (-) com AB1; Hb (+) com AB5 e  $T_4L$  (+) com AB1A, AB4 e AB8.

9) Após a HRT as correlações das variáveis da BChE (TABELA 29), deve-se à correlação de: idade (-) com AB7; IMC (+) com AB7 e AB8; LDL-C (+) com AB9 e AB11; TG (+) com AB1A e AB7;  $T_4L$  (+) com AB1B, AB2, AB7 e AB9 e do  $E_2$  (-) com AB4, AB5 e AB7.

10) Foi observado o aparecimento de duas bandas adicionais (AB1A e AB1B) com alta frequência nas mulheres climatéricas.

## 8 REFERÊNCIAS

ABBOTT C. A. et al. Relationship between serum butyrylcholinesterase activity, hypertriglyceridaemia and insulin sensitivity in diabetes mellitus. **Clinical Science**, London, v. 85, p. 77-81, 1993.

ABESO – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA PARA O ESTUDO DA OBESIDADE. Disponível no site [www.abeso.org.br](http://www.abeso.org.br). Acesso em 03/11/2003.

ABOU-HATAB, K. et al. Relationship between age and plasma esterases. **Age and Ageing**, London, v. 30, n. 1, p. 41-45, 2001.

ACOG - EDUCATIONAL BULLETIN. Hormone Replacement therapy. **International Journal of Gynaecology and Obstetrics**, New York, n. 247, 1988.

ACTA MÉDICA PORTUGUESA, Terapêutica hormonal de substituição. **Menopausa**, Portugal, v. 10, p. 713-714, 1997.

ALCÂNTARA, V. M. **Fenótipos da butirilcolinesterase e suas relações com dados antropométricos, bioquímico-hormonais e pressão arterial em obesos e na população geral de Curitiba, PR**. Curitiba, 2000. 230 f. Tese (Doutorado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

ALCÂNTARA, V. M.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E. A.; CULPI, L. CHE1 a serum cholinesterase phenotype in Whites and Non-Whites from Southern Brazil as determined by a new method. **Human Heredity**, Basel, v. 41, n. 2, p. 103-106, 1991.

ALCÂNTARA, V. M. et al. Association of the *CHE2* locus with body mass index and butyrylcholinesterase activity. **Human Biology**, London, v. 73, n. 4, p. 587-595, 2001.

ALCÂNTARA, V. M. et al. Butyrylcholinesterase activity and risk factors for coronary artery disease. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, Oslo, v. 62, p. 399-404, 2002.

ALCÂNTARA, V. M. et al. The variable expression of the  $C_{4/5}$  complex of human butyrylcholinesterase and body mass index. **Human Biology**, London, v. 75, n. 1, p. 47-55, 2003a.

ALCÂNTARA, V. M. et al. Butyrylcholinesterase and obesity in individuals with the CHE2 C5+ and CHE2 C5- phenotypes. **International journal of obesity and related metabolic disorders**, Hampshire, v. 27, n. 12, 2003b.

ALTLAND, K. et al. New biochemical and immunological data on quantitative and qualitative variability of human pseudo-cholinesterase. **Humangenetik**, Berlin, v. 14, p. 56-60, 1971.

ANDERSON, E. J. et al. Body composition and energy balance: lack effect of short-term hormone replacement in postmenopausal women. **Metabolism**, New York, n. 50, v. 3, p. 265-269, 2001.

ANNAPURNA, V. et al. Relationship between serum pseudocholinesterase and tryglicerides in experimentally induced diabetes mellitus in rats. **Diabetologia**, Berlin, v. 34, n. 5, p. 320-324, 1991.

ANTOPOL, W.; TUCHMAN, L.; SCHIFRIN, A. A. Cholinesterase activity of human sera with special reference to hyperthyreoidism. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, New York, v. 36, p. 46-50, 1937.

ARCHER, T. L.; JANOWSKY, E. C. Plasma pseudocholinesterase deficiency associated with diethylestilbestrol therapy. **Anesthesia and Analgesia**, Baltimore, v. 57, p. 726-729, 1978.

ARNAUD, J. et al. Serum cholinesterase polymorphism in France: an epidemiological survey of the deficient alleles detected an automated micro-method. **Annals of Human Biology**, London, v. 18, n. 1, p. 1-8, 1991.

ARPAGAUS, M. et al. Structure of the gene for human butyrylcholinesterase. Evidence for a single copy. **Biochemistry**, Washington, v. 29, n. 1, p. 124-131, 1990.

AUGUSTINSSON, K. B. Cholinesterase and anticholinesterase agents. In: Koelle, G. B. **Handbook of Experimental Pharmacology**, Berlin: Springer-Verlag, 1963, p. 89-128.

BARACAT, E. et al. Estrogen activity and novel tissue selectivity of delta 8,9-dehydroesterone sulfate in postmenopausal women. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, Bethesda, v. 84, n. 6, p. 2020-2027, 1999.

BARNES, J. F. et al. A comparison of the effects of two continuous HRT regimens on cardiovascular risk factors. **Atherosclerosis**, Amsterdan, v. 160, n. 1, p. 185-193, 2002.

BARTELS, C. F.; JAMES, K.; LA DU, B. N. DNA a mutations associated with the human butyrylcholinesterase J-variant. **American Journal of Human Genetics**, Baltimore, v. 50, n. 5, p. 1104-1114, 1992.

BLITT, C. D. et al. Correlation of plasma cholinesterase activity and duration of action of succinylcholine during pregnancy. **Anesthesia and Analgesia**, Cleveland, v. 56, n. 1, p. 78-81, 1977.

BLUMEL, J. H. et al. Changes in body mass index around menopause: a population study of Chilean woman. **Menopause: The Journal of The American Menopause Society**, [S. I.], v. 8, n. 4, p. 239-244, 2001.

BRAUNWALD, E. et al. **Harrison's Principles of Internal Medicine**. New York: McGraw-Hill, 2001, p. 2257.

BROWN, S. S. et al. The plasma cholinesterases: a new perspective. **Advances in Clinical Chemistry**, New York, v. 22, p. 1-123, 1981.

BULPITT, C. J. et al. Age differences in biochemical and hematological measures during middle age. **Aging**, Milano, v. 6, n. 5, p. 359-367, 1994.

CALIC, R.; STRAUS, B.; CEPELAK, I. Changes of activities of some transferases, alkaline phosphatase and cholinesterase in the blood of women using oral contraceptives and in vitro influence of the agents on tissular enzyme levels in rat liver. **Zeitschrift Fur Medizinische Laboratorium Diagnostik**, Berlin, v. 30, n. 7, p. 375-383, 1989.

CALLAWAY, S.; DAVIES, D. R.; RUTLAND, J. P. Blood cholinesterase levels and range of personal variation in a healthy adult population. **British Medical Journal**, London, v. 2, p. 812-816, 1951.

CAMMISA, H. M.; ISOM, H. C.; GREENE, F. E. Hormonal regulation of pseudocholinesterase activity in cultured rat hepatocytes. **Endocrinology**, Baltimore, v. 122, n. 3, 1988.

CARMONA, G. N. et al. Butyrylcholinesterase accelerates cocaine metabolism: in vitro and in vivo effects in nonhuman primates and humans. **Drug Metabolism Disposition**, Baltimore, v. 28, n. 3, p. 367-371, 2000.

CARR, B. R.; GRIFFIN, J. E. Fertility control and its complications. In: WILSON, J. D. et al. **Williams textbook of endocrinology**. 9<sup>a</sup> ed., Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1998, p. 908.

CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E. A. **Relação entre os fenótipos do loco *CHE2* da colinesterase do soro e o peso individual em duas amostras do sul do Brasil**. Curitiba, 1989. Tese (Professor Titular) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E. A. et al. The C<sub>5</sub> isozyme of serum cholinesterase and adult weight. **Human Heredity**, Basel, v. 41, n. 5, p. 330-339, 1991.

CHU, M. I. et al. Cholinesterase in serum and low density lipoprotein of hyperlipidemic patients. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 85, n. 1, p. 55-59, 1978.

CLITHEROW, J.W.; MITCHARD, M.; HARPER, N.J. The possible biological function of pseudocholinesterase. **Nature**, London, v.199, p. 1000-1001, 1963.

CROOCK, M.; HAQ, M.; TUTT, P. Serum lipids, acute phase proteins and serum cholinesterase in normal subjects. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, Oslo, v. 54, n. 8, p. 601-603, 1994.



CUCUIANU, M. et al. Serum pseudocholinesterase and ceruloplasmin in various types of hiperlipoproteinemia. **Clinical Chemica Acta**, Amsterdam, v. 59, p. 19-27, 1975.

DALE, H. H. The action of certain esters and ethers of choline and there relation to muscarine. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Bethesda, v. 6, p. 147-190, 1914.

DALLONGEVILLE, J. et al. Multiple coronary heart disease risk factors are associated with menopause and influenced by substitutive hormonal therapy in a cohort of French women. **Atherosclerosis**, Amsterdan, v. 118, p. 123-133, 1995.

DANIEL, J. M.; DOHANICH, G. P. Acetylcholine mediates the estrogen-induced increase in NMDA receptor binding in CA<sub>1</sub> of the hippocampus and the associated improvement in working memory. **The Journal of Neuroscience**, Washington, v. 21, n. 17, p. 6949-6956, 2001.

DARVESH, S.; HOPKINS, A. D.; GEULA, C. Neurobiology of butyrylcholinesterase. **Nature Reviews Neuroscience**, London, v. 4, p. 131-138, 2003.

DIETZ, A. A.; RUBINSTEIN, H. M.; LUBRANO, T. Colorimetric determination of serum cholinesterase and its genetic variants by the propionylthiocholine-dithiobis (nitrobenzoic acid) procedure. **Clinical Chemistry**, Washington, v. 19, p. 1309-1313, 1973.

III Diretrizes brasileiras sobre dislipidemias e Diretriz da prevenção da aterosclerose. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, Rio de Janeiro, v. 77, S-III, 2001.

DORMIRE S. L.; REAME, N. K. Menopausal hot flash frequency changes in response experimental manipulation of blood glucose. **Nursing Research**, New York, v. 52, n. 5, p. 338-343, 2003.

DUBBS, C. A. Ultrasonic effects on isoenzymes. **Clinical Chemistry**, Washington, v. 1, p. 181-186, 1966.

EHRLICH, G. et al. Use of partially phosphorothioated "antisense" oligodeoxynucleotides for sequence-dependent modulation of hemopoiesis in Culture. **Antisense Research and Development**, New York, v. 4, n. 3, p. 173-183, 1994.

EIBERG, H. et al. Linkage between serum cholinesterase 2 (CHE) and gama-crystallin gene cluster (CRYG): assignment to chromossome 2. **Clinical Genetics**, Copenhagen, v. 35, n. 5, 313-321, 1989.

EKHOLM, M. **Molecular modeling of substrates and inhibitors of acetylcholinesterases and butyrylcholinesterases**. Faculty of Science: University of Helsinki, 2001. Disponível em <http://ethesis.helsinki.fi>.

ERBERICH, L. C. et al. Hormone replacement therapy in postmenopausal women and its effects on plasma lipid levels. **Clinical chemistry and laboratory medicine**, Berlin, v. 40, n. 5, p. 446-451, 2002.

EVANS, R. T. et al. A family segregating for E1j and E1k at cholinesterase locus 1. **Journal of Medical Genetics**, London, v. 17, n. 6, p. 464-467, 1980.

EVANS, R. T.; WROE, J. In serum cholinesterase activity a predictor of succinyl choline sensitive? An assessment of four methods. **Clinical Chemistry**, Washington, v. 24, n. 10, p. 1762-1766, 1978.

FABER, M. Serum cholinesterase in disease. **Acta Medica Scandinavica**, Stockholm, v. 114, p. 59-71, 1943.

FADEL-PICHETH, C. M. T. **Variabilidade do loco BCHE da butirilcholinesterase e peso do adulto em amostra de Curitiba**. Curitiba, 1991. Dissertação (Mestrado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

FAIRBROTHER, A. et al. Influence of menstrual cycle on serum cholinesterase. **Environmental Research**, Bethesda, n. 49, p. 181-189, 1988.

FDA - FEDERAL REGISTER: RULES AND REGULATIONS. Washington, Food and Drugs, v. 64, n. 206, p. 57699-57733, 1999.

FEDERAÇÃO BRASILEIRA DAS SOCIEDADES DE GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA – FEBRASGO – E SOCIEDADE BRASILEIRA DO CLIMATÉRIO – SOBRAC. Disponível em <http://www.febrasgo.org.br/posicao.htm>. Acesso em 30 dez. 2002.

FULLER, B. H.; BERGER, G. M. B. Automation of serum cholinesterase assay - pediatric and adult reference ranges. **South African Medical Journal**, Cape Town, v. 78, n. 10 p. 577-580, 1990.

GARRY, P. J. et al. New allele at cholinesterase locus 1. **Journal of Medical Genetics**, London, v. 13, n. 1, p. 38-42, 1976.

GEVORKIAN, E. S.; SARKISIAN, E. G.; PANOSIAN, G. A. Induction of various enzymes in the rabbit uterus with estradiol. **Voprosy Meditsinskoi Khimii**, Moskva, v. 28, n. 6, p. 15-18, 1982.

GNATT, A. et al. Human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase are encoded by two distinct genes. **Cellular and Molecular Neurobiology**, New York, v. 11, n. 1, p. 91-104, 1991.

GOLDSLAND, I. F. Effects of postmenopausal hormone replacement therapy on lipid, lipoprotein, and apolipoprotein(a) concentrations: analysis of studies published from 1974-2000. **Fertility and Sterility**, New York, v. 75, n. 5, p. 898-915, 2001.

GOPALAM, K. B.; RAO, P. R. Genetic studies on Vysyas of Andhra Pradesh, S. India, A1A2BO, Rh (O) D, transferrin, group specific component, haptoglobin and pseudocholinesterase types. **Acta Anthropogenetic**, New Delhi, v. 5, n. 3, p. 175-180, 1981.

GREENDALE, G. A.; SOWERS, M. The menopause transition. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, Philadelphia, v. 26, n. 2, p. 261-277, 1997.

GUTSCHE B. B.; SCOTT, E. M.; WHRIGHT, R. C. Hereditary deficiency of pseudocholinesterase in Eskimos. **Nature**, London, v. 215, n. 98, p. 322-323, 1967.

HADA, T. et al. Study of serum cholinesterase isozyme in patients with liver cirrhosis and primary hepatoma. **Enzyme**, Basel, v. 40, p. 38-39, 1988.

HAN, K. K. et al. Benefits of soy isoflavone therapeutic regimen on menopausal symptoms. **The American College of Obstetricians and Gynecologists**, New York, v. 99, n. 3, p. 389-394, 2002.

HARRIS, H. et al. Genetical studies on a new variant of serum cholinesterase detected by electrophoresis. **Annual of Human Genetics**, London, v. 26, p. 359-382, 1963.

HARRIS. H.; HOPKINSON, D. A.; ROBSON, E. B. Two dimensional electrophoresis of pseudocholinesterase components in normal serum. **Nature**, London, v. 196, p. 1296-1298, 1962.

HARRIS, H.; WHITTAKER, M. Differential inhibition of "usual" and "atypical" serum cholinesterase by Na and NaF. **Annual of Human Genetics**, London, v. 27, p. 53-58, 1963.

HAUPT, H. et al. Isolation and physico-chemical characterization of cholinesterase in human serum. **Blut**, Berlin, v.14, p. 65-75, 1966.

HAZEL, B.; MONIER, D. Human serum cholinesterase: variations during pregnancy and post-partum. **Canadian Anesthesiology Society Journal**, Toronto, v. 18, n. 3, p. 272-277, 1971.

HINDERLITER, A. L. et al. Changes in hemodynamics and left ventricular structure after menopause. **The American Journal of Cardiology**, New York, v. 89, n. 7, p. 830-833, 2002.

HOSENFELD, D.; SCHRÖTER, E. Concerning the questions of individual constancy and individual specificity of three serum enzyme activities (serum cholinesterase EC 3.1.1.8, ceruloplasmin EC 1.10.3.2 and alkaline phosphatase EC 3.1.3.1). **Humangenetik**, Berlin, v. 9, p. 38-42, 1970.

ILLSLEY, N. P.; LAMARTINIER, C. A. Endocrine regulation of rat serum cholinesterase activity. **Endocrinology**, Baltimore, v. 108, p. 1737-1743, 1981.

IOSIF, C. S. Effects of protracted administration of estriol on the lower genitourinary tract in postmenopausal women. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, Berlin, v. 251, n. 3, p. 115-120, 1992.

IUBMB ENZYME NOMENCLATURE. Disponível em:  
<http://www.chem.qmw.ukiubmbenzyme/EC3/1/1/8.html> Acesso 07 abr. 2003.

JOHNSON, S. R. The clinical decision regarding hormone replacement therapy. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, Philadelphia, v. 26, n. 2, p. 414-435, 1997.

JULL, P. Human plasma cholinesterase isoenzymes. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 19, n. 2, p. 205-213, 1968.

KALIBER, E. L. et al. Relationships of serum estradiol levels, menopausal duration and mood during hormonal replacement therapy. **Psychoneuroendocrinology**, Londres, v. 22, p. 549-558, 1997.

KALOW, W.; STARON, N. On distribution and inheritance of atypical forms of human cholinesterase as indicated by dibucaine numbers. **Canadian Journal of Biochemistry**, Ottawa, v. 35, p. 1305-1320, 1957.

KAPLAN, R. M. et al. Attempts to engineer and enzyme-mimic of butyrylcholinesterase by substitution of the six divergen aromatic amino acids in the active center of acetylcholinesterase. XI<sup>th</sup> International Symposium on Cholinergic Mechanisms - Function and dysfunction. Switzerland, 5 - 9 may 2002.

KAUNITZ, A. M. The role of androgens in menopausal hormone replacement. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, Washington, v. 26, n. 2, p. 391-397, 1997.

KJELLSTRAND, M. et al. Effects of solvent exposure on testosterone levels and butyrylcholinesterase activity in mice. **Acta Pharmacologica et Toxicologica**, Copenhagen, v. 57, p. 242-249, 1985.

KODAK DIGITAL. **Corel Photo Paint 9**. New York, 1995-1997, 1 CD-ROM.

KODAK 1D. **Image Analysis Software for Windows**. New York, v. 3.5, 1994-2000, 1 CD-ROM.

KUTTY, K. M. et al. Serum pseudocholinesterase: high density lipoprotein cholesterol ratio as an index of risk for cardiovascular disease. **Clinical Chimica Acta**, Amsterdam, v. 115, p. 55-61, 1981.

KUTTY, K. M.; PAYNE, R. H. Serum pseudocholinesterase and very-low-density lipoprotein metabolism. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, New York, v. 8, p. 247-250, 1994.

KUTTY, K. M.; ROWDEN, G.; COX, A. R. Interrelationship between serum-lipoprotein and cholinesterase. **Canadian Journal of Biochemistry**, Ottawa, v. 51, n. 6, p. 883-887, 1973.

LAMARTINIERE, C. A. Growth hormone modulates serum cholinesterase. **Endocrinology**, Baltimore, v. 118, n. 3, p. 1252-1254, 1986.

LAMOTTA, R. V. et al. Multiple forms of serum cholinesterase. **Archives Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 124, p. 299-308, 1968.

LAWRENCE, S. H.; MELNICK, P. J. Enzymatic activity related to human serum  $\beta$ -lipoprotein: histological, immunoelectrophoretic and quantitative studies. **Proceedings of The Society for Experimental Biology and Medicine**, New York, v. 107, p. 998-1001, 1961.

LAYER, P. G. Cholinesterases and their functions during intercellular and intracellular communication, 1998. Disponível em: <http://neuro.bio.tu.darmstadt.de/layer/index.htm>. Acesso em 10 de fev. de 2003

LEHMANN, D. J. et al. Association of the androgen receptor CAG repeat polymorphism with Alzheimer's disease in men. **Neuroscience Letters**, Amsterdam, v. 340, n. 2, p. 87-90, 2003.

LI, B. et al. Abundant tissue butyrylcholinesterase and its possible function in the acetylcholinesterase knockout mouse. **Journal Neurochemistry**, New York, v. 75, n. 3, p. 1321-1331, 2000.

LIAO, J. et al. Different glycosylation in acetylcholinesterases from mammals brain and erythrocytes. **Journal Neurochemistry**, New York, v. 58, p. 1230-1238, 1992.

LOCKRIDGE, O. et al. Complete amino acid sequence of human serum cholinesterase. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 262, n. 2, p. 549-557, 1987.

LOCKRIDGE, O.; ECKERSON, H. W.; LA DU, B. N. Interchain disulfide bonds and subunit organization in human serum cholinesterase. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 254, p. 8324-8330, 1979.

LOKE, D. F. et al. Lipid and biochemical changes after low-dose oral contraception. **Contraception**, Los Altos, v. 46, n. 3, p. 227-241, 1992.

LOPES, P. Treatments for menopause. **Contraception, Fertility, Sexualite**. Paris, v. 26, n. 4, p. 266-278, 1998.

LORENTZEN, J. Perspectives of hormone replacement. Disponível em: <http://wrightnewsletter.com.villagecompoundingpharmacyarticle> acessado em abril, 2002.

LUCA, L. A.; LUCA, H. M.; CRISTIUMA, K. Influência dos esteróides sexuais em terapêutica de reposição hormonal (TRH), sobre a formação da placa aterosclerótica e efeito de proteção cardiovascular. **Jornal Brasileiro de Medicina**, São Paulo, v. 70, n. 1/2, 1996.

LUINE, V. N.; HARDING, C. F.; BLEISCH, W. Specificity of gonadal hormone modulation of cholinergic enzymes in the avian syrinx. **Brain Research**, Elsevier, v. 279, p. 339-342, 1983.

MADDINENI, V. R.; MIRAKHUR, R. K.; MCCOY, E. P. Plasma cholinesterase activity in elderly and young adults. **British Journal of Anaesthesia**, London, v. 72, p. 497, 1994.

MAGARIAN, E. O.; DIETZ, A. J. Correlation of cholinesterase with serum lipids and lipoproteins. **Journal of Clinical Pharmacology**, Stamford, v. 27, p. 819-820, 1987.

MANTOVANI, G. et al. Association of serum IL-6 with comprehensive e geriatric assessment variables in a population of elderly cancer patients. **Oncology Reports**, Athens, v. 11, n. 1, p. 197-206, 2003.

MARTINEZ, T. L. R. et al. Dislipidemias em mulheres. In: MARTINEZ, T. L. R et al. **Condutas clínicas nas dislipidemias**. Belo Horizonte: Livraria e Editora Saúde Ltda, 1997, p. 215-227.

MASSON, P. A. Multiple molecular forms of human plasma bytyrlycholinesterase. I apparent molecular parameters and broad pattern of the quaternary structure. **Biochimica Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 578, n. 2, p. 493-504, 1979.

MASSON, P. A. naturally occuring molecular form of human plasma cholinesterase in an albumin conjugate. **Biochimica Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 998, n. 3, p. 258-266, 1989.

MASSON, P. A. Molecular heterogeneity of human cholinesterase. In: MASSOULIÉ, J. et al. **Cholinesterase: Structure, Function, Mechanisms, Genetics and Cell Biology**, Washington: American Chemical Society, 1991.

MASSON, P.; CHATONNET, A.; LOCKRIDGE, O. Evidence for a single butyrylcholinesterase gene in individuals carrying the C<sub>5</sub> plasma cholinesterase variant (*CHE2*). **FEBS Letter**, Amsterdam, v. 262, n. 1, p. 115-118, 1990.

MASSON, P. et al. Butyrylcholinesterase-catalysed hydrolisys of aspirin negatively charged ester, and aspirin-related neutral esters. **Biochimica Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1387, n. 1-2, p. 41-52, 1998.

MASSOULIÉ, I. et al. Molecular and cellular biology of cholinesterases. **Progress in. Neurobiology**, New York, v. 41, p. 31-91, 1993.

MATTHEWS, K. A. et al. Influence of the perimenopause on cardiovascular risk factors and symptoms of middle-age healthy women. **Archives of Internal Medicine**, Chicago, v. 154, p. 2349-2355, 1994.

MCKEON, V. A. Exploring HRT. **AWHONN lifelines - Association of Women's Health, Obstetric and Neonatal Nurses**, Philadelphia, v. 6, n. 1, p. 24-31, feb./mar. 2002.

MCTIERNAN, C. et al. Brain cDNA clone for human cholinesterase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 84, n. 19, p. 6682-6686, 1987.

MINIC J. et al. Butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase activity and quantal transmitter release at normal and abnormal acetylcholinesterase knockout mouse neuromuscular junctions. **British Journal of Pharmacology**, London, v. 138, n. 1, p. 177-187, 2003.

MJA - The Medical Journal of Australia Obesity. Disponível em: <http://www.mja.com.au> acessado em abril, 2003.

MORROW, A. C; MOTULSKY, A. G. Rapid screening method for the common atypical pseudocholinesterase variant. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 71, p. 350-356, 1968.

MOURANT, A.E.; KOPÉC, A.C.; DOMANIEWSKA-SOBCZAK, K. **The distribution of human blood groups and others polymorphisms**. 2nd ed. London: Oxford University, 1976.

MUENSCH, H. et al. Structural difference at the active site of dibucaine resistant variant of human plasma cholinesterase. **American Journal of Human Genetics**, Baltimore, v. 30, n. 3, p. 302-307, 1978.

MYERS, M.; RICHMOND, R. C.; OAKESHOTT, J. G. On the origins of esterases. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 5, n. 2, p. 113-119, 1988.

NACHON, F. et al. Engineering of a monomeric and low-glycosylated form of human butyrylcholinesterase. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 269, n. 2, p. 630-637, 2002.

NAMS – THE NORTH AMERICAN MENOPAUSE SOCIETY. Menopause curriculum study guide. Disponível em: <http://www.menopause.org/educ=materials/studyguide/sgtoc.html>, acessado em fevereiro de 2003

NOUSIAINEN, U.; RYHANEN, R. Serum lipids and hepatic microsomal enzymes with special reference to serum cholinesterase in wistar rats. **General Pharmacology**, Oxford, v. 15, n. 2, p. 123-127, 1984.

OHKAWA, J.; FURUYA, I.; TABATA, S. Chemical characterization of C<sub>5</sub> cholinesterase isoenzyme. **Enzyme**, Basel, v. 40, n. 1, p. 37-38, 1988.

ORESKOVIC, K.; KUNEC-VAJIC, E. Pseudocholinesterase in alloxan-diabetic rats. **Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology**, Westbury, v. 78, n. 1, p. 117-120, 1992.

PALACIOS, S. Tibolone: what does tissue specific activity mean? **Maturitas**, Amsterdam, v. 37, p. 159-165, 2001.

PATEL, B. N. et al. Serum esterase activities and hiperlipidaemia in the streptozotocin-diabetic rats. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1035, n.1, p. 113-116, 1990.

PATINKIN, D. et al. Antisense inhibition of butyrylcholinesterase gene expression predicts adverse hematopoietic consequences to cholinesterase inhibitors. **Cellular and Molecular Neurobiology**, New York, v. 14, n. 5, p. 459-473, oct. 1994.

PAVKOVIC, E. et al. Serum paraoxonase and cholinesterase activities in individuals with lipid and glucose metabolism disorders. **Chemico-biological Interactions**, Amsterdam, v. 87, n. 1-3, p. 179-182, 1993.

PERRY, W.; WISEMAN, R. A. Combined oral estradiol valerate-norethisterone treatment on years in postmenopausal women: effect on lipids, coagulation factors, hematology and biochemistry. **Maturitas**, Amsterdam, v. 42, n. 2, p. 157-164, 2002.

PESTEL, G.; SPRENGER, H.; ROTHHAMMER, A. Frequency distribution of dibucaine numbers in 24,830 patients. **Der Anaesthesist**, Berlin, v. 56, n. 6, p. 495-499, 2003.

PICHETH, G. et al. An improved method for butyrylcholinesterase phenotyping. **Biochemical Genetics**, New York, v. 32, n. 3-4, p. 83-89, 1994.

POPOVIC, L. et al. The relation between plasma lipid levels and pseudocholinesterase activity in hypothyroidism. **Hormone and Metabolic Research**, Stuttgart, v. 30, p. 137-140, 1998.

PRESCRIRE INTERNATIONAL. Tibolone: new preparation. Menopausal symptoms: oestrogen/progestogen combinations are still the reference treatment. **Prescrire International**, Paris, v. 11, n. 59, p. 79-82, 2002. (No author listed)

PRODY, C. A. et al. Isolation and characterization of full-length cDNA on coding for cholinesterase from fetal human tissues. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 84, n. 11, p. 3555-3559, 1987.

PUBMED.com. Disponível em: [www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez). Acessado em abril de 2002.



RANDELL, E. W.; ROGERS, B.; SMITH, E. Production of butyrylcholinesterase by Caco-2 cells: lack of relationship with triglyceride production. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Sweden, v. 58, n. 9, p. 1327-1332, 2001.

REDDERSON, C. L. Interactions of steroids and serum cholinesterase. **International Journal of Clinical Pharmacology, Therapy and Toxicology**, München, v. 8, p. 51, 1973.

RICCARDI, G. Hormones, diabetes mellitus and lipoprotein metabolism. **Current Opinion in Lipidology**, Philadelphia, v. 1, p. 237-243, 1990.

ROBERTSON, G. S. Serum cholinesterase deficiency II: pregnancy. **British Journal of Anesthesia**, London, v. 38, p. 361-369, 1966.

ROBERTSON, G. S. Serum protein and cholinesterase changes in association with contraceptive pills. **The Lancet**, New York, v. 4, 1967.

ROBINSON, A. R. et al. A new technique for differentiation of hemoglobin. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, St. Louis, v. 50, p. 745-752, 1957.

ROZENBERG et al. Educating patients about the benefits and drawbacks of hormone replacement therapy. **Drugs and Aging**, Mairangi, v. 13, n. 1, p. 33-41, 1998.

SAEED, S. A.; CHADWICK, G. R.; MILL, P. J. Action of proteases on human plasma cholinesterase isoenzymes. **Biochimica Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 229, n. 1, p. 186-192, 1971.

SALGADO FILHO, W.; MARTINEZ, T. L. R.; ALDRIGHI, J. M. Dislipidemias em mulheres. In: MARTINEZ, T. L. R., **Manual de Condutas Clínicas em dislipidemias**, Rio de Janeiro: Editora Medline, 2003, p. 239-250.

SAMBROOK, J.; FRISCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning. A laboratory Manual**, Philadelphia: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SAXENA, A. et al. **Human butyrylcholinesterase: a bioescavenger for protection against organophosphate chemical warfare agents**. In: 23<sup>rd</sup> Army Science Conference. Department Army – U.S.A. , 2002, p. 1-6.

SCHINDLER, A. E. Thyroid function and postmenopause. **Gynecological Endocrinology**, Carnforth, v. 17, n. 1, p. 79-85, 2003.

SCHNEIDER, L. S. Treatment of Alzheimer's disease with cholinesterase inhibitors. **Clinics in Geriatric Medicine**, Philadelphia, v. 17, n. 2, p. 337-358, 2001.

SCOTT, E. M.; POWERS, R. F. Properties of C<sub>5</sub> variant form of human serum cholinesterase. **American Journal of Human Genetics**, Baltimore, v. 83, 1972.

SHAFFERMAN, A. et al. Mutagenesis of human acetylcholinesterase. Identification of residues involved in catalytic activity and in polipeptide folding. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, n. 267, v. 25, p. 17640-17648, 1992.

SHIRAI, K. et al. Cholesterol ester hydrolyzing activity by pseudocholine esterase and its possible role in lipoprotein metabolism. **The Journal of Biology Chemistry**, Baltimore, v. 260, p. 5225, 1985.

SHNIDER, S. M. Serum cholinesterase activity during pregnancy, labor and the puerperium. **Anesthesiology and Analgesia**, Baltimore, v. 26, n. 3, p. 335-339, 1975.

SIDDEL, F. R.; KAMINSKIS, A. Influence of age, sex and oral contraceptives on human blood cholinesterase activity. **Clinical Chemistry**, Washington, v. 21, n. 10, p. 1393-1395, 1975.

SIMON, N. M. et al. Serum cholinesterase deficiency in renal failure. **Transactions - American Society for Artificial Internal Organs**, Chicago, v. 15, p. 328-332, 1969.

SORENSEN, M. B. et al. Obesity and sarcopenia after menopause are reserved by sex hormone replacement therapy. **Obesity Research**, Baton Rouge, v. 9, p. 622-626, 2001.

SOREQ, H. et al. Human cholinesterase genes localized by hybridization to chromosomes, 3 and 16. **Human genetics**, Berlin, v. 77, n. 4, p. 325-328, 1987.

SOTELO, M. M.; JOHNSON, S. R. The effects of hormone replacement therapy on coronary heart disease. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, Philadelphia, v. 26, n. 2, p. 313-325, 1997.

SOUZA, R. L. R. Estudos sobre nova banda da butirilcholinesterase humana (C<sub>4/5</sub>) verificada em eletroforese. Curitiba, 1995. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

SOUZA, R. L. R. et al. Nova banda da butirilcolinesterase humana detectada em fenótipos CHE2 C5-. **Revista Brasileira de Genética**, São Paulo, v. 16, p. 103, 1993.

SOUZA, R. L. R. et al. Frequencies of the butyrylcholinesterase K mutation in Brazilian populations of European and African origin. **Human Biology**, Detroit, v. 70, n. 5, p. 965-970, 1998.

SOUZA, R. L. R. Variação fenotípica e genotípica da butirilcolinesterase humana e sua relação com a altura e índice de massa corporal. Curitiba, 2001. Tese (Doutor em Ciências Biológicas) - Genética, Universidade Federal do Paraná.

SPARKES, R. S. et al. Genetic linkage studies of transferrin, pseudocholinesterase, and chromosome 1 loci. **Human Heredity**, Basel, v. 34, n. 2, p. 96-100, 1984.

STATSOFT, Inc. Statistica for Windows (Computer program manual). Tulsa, 1996. 1 cd. sample from Santa Catarina (Southern Brazil). **Revista Brasileira de Genética**, Rio de Janeiro, v. 8, p. 535-543, 1985.

STEDMAN, E.; STEDMAN, E.; EASSON, L. H. Cholinesterase: an enzyme present in the blood serum of the horse. **The Biochemical Journal**, London, v. 26, p. 2056-2066, 1932.

STEVENSON, J. C.; MALCOM, I. Hormone replacement therapy. **British Medical Journal**, London, v. 325, p. 113-114, 2002.

STEVENSON, J. C.; WHITEHEAD, M. I. Hormone replacement therapy, disponível em <<http://bmj.com>. Acesso em jan/2003.

SUN, H. et al. Predicted Michaelis-Menten complexes of cocaine-butrylcholinesterase. **Journal of Biological Chemistry**, Amsterdam, v. 276, n. 12, p. 9330-9336, 2001.

SUSSMAN, J. L. et al. Atomic structure of acetylcholinesterase from Torpedo californica: a prototypic acetylcholine-binding protein. **Science**, Washington, v. 253, n. 5022, p. 872-879, 1991.

THE JEAN HAILES FOUNDATION. What de Evidence, reasons for and impact of weight gain during menopause? **Medical Journal of Australia**, Sidnei, v. 173, n. 6, p. 100-101, 2000).

THE MERCK MANUAL OF DIAGNOSIS AND THERAPY. **Gynecology and Obstetrics**, Section 18, chapter 236, 2002.

THOMPSON, J. C.; WHITTAKER, M. Pseudocholinesterase activity in thyroid disease. **Journal of Clinical Pathology**, London, v. 18, p. 811-812, 1965.

VAN BAAL, W. M.; KOOISTRA, T.; STEHOUWER, C. D. Cardiovascular disease risk and hormone replacement therapy (HRT): a review based on randomised, controlled studies in postmenopausal women. **Current Medical Chemistry**, Schiphol, v. 7, n. 5, p. 499-517, 2000.

VANKRIEKEN, L.; LUTHART, K. Apoio laboratorial no acompanhamento da menopausa e da osteoporose. **Revista Laes & Haes**, São Paulo, v. 2, n. 136, p. 204-230, 2002.

VAN ROS, G.; VERVOORT, T. Frequencies of the atypical and C<sub>5</sub> variants of serum cholinesterase in Zairians and Belgians. Detection of the C<sub>5</sub> variant by agar gel electrophoresis with an acid buffer. **Société Belge de Médecine Tropicale**, Bruxelles, v. 53, p. 633-644, 1973.

VERGNES, H.; SEVIN, J.; PERALTA, M. Plasma cholinesterase variants in population samples from South-West France. **Annals of Human Biology**, London, v. 8, n. 1, p. 59-63, 1981.

VON ECKARDSTEIN, A. et al. Tibolone lowers high density lipoprotein cholesterol by increasing hepatic lipase activity but does not impair cholesterol efflux. **Clinical Endocrinology**, Springfield, v. 58, n. 1, p. 49-58, 2003.

VORHAUS, L. J.; KARK, R. M. Serum cholinesterase in health and disease. **The American Journal of Medicine**, New York, v. 14, n. 6, p. 709-719, 1953.

WALDEN, C. E. et al. Effect of estrogen/progestin potency on clinical chemistry measures. The lipid research clinics program prevalence study. **American Journal of Epidemiology**, Baltimore v. 123, n. 3, p. 517-531, 1986.

WEBER; U.; BRANK; M.; GRUBIE, Z. Glucocorticoids differentially control synthesis of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in rat liver and brain. **Chemico-Biological Interactions**, Amsterdam, v. 119-120, p. 341-347, 1999.

WHITTAKER, M. Cholinesterase. New York: Karger, Basel, 1986.

WHITTAKER, M.; BRITTEN, J. J. Phenotyping of individuals sensitive to suxamethonium. The cholinesterase research unit at the Royal Postgraduate Medical School. **British Journal of Anesthesia**, Itrincham, v. 59, n. 8, p. 1052-1055, 1987.

WHITTAKER, M.; BRITTEN, J. J. Segregation of the E1j gene for plasma cholinesterase in family studies. **Human Heredity**, Basel, v. 39, n. 1, p. 1-6, 1989.

WHITTAKER, M.; BRITTEN, J. J.; WICKS, R. J. Inhibition of the plasma cholinesterase variants by propranolol. **British Journal of Anesthesia**, Itrincham, v. 53, n. 5, p. 511-516, 1981.

WHITTAKER, M.; CHARLIER, A. R.; RAMASWAMY, S. Changes in plasma cholinesterase isoenzymes due to oral contraceptives. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 26, p. 373-375, 1971.

WIEDEMANN, E.; SCHWARTZ, E. Supression of growth hormone-dependent human serum sulfation factor by estrogen. **The Journal of Clinical Endocrinology**, Springfield, v. 34, p. 51-58, 1972.

YANG, C.; CHEN, S. Two organochloride pesticides, toxophene and chlordane, are antagonists for estrogen-related receptor  $\alpha$ -1 orphan receptor. **Cancer Research**, Chicago, v. 59, p. 44519-4524, 1999.

YUSUF, S.; ANAND, S. Hormone replacement therapy: a time for pause. **Canadian Medical Association**, Ontario, v. 167, n. 4, p. 357-363, 2002.

## 9 ANEXOS

### ANEXO 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E INFORMADO

Você está sendo convidada a participar de um estudo intitulado “*Atividade da butirilcolinesterase, (BChE) antes e após terapia de reposição hormonal, no climatério*”. É através das pesquisas clínicas que ocorrem os avanços na medicina e sua participação é de fundamental importância.

1. O objetivo desta pesquisa é tentar observar como se comporta a enzima da BChE (ainda não se sabe qual a sua função no organismo humano), que se altera quando se tem alteração no valor do estradiol (hormônio que diminui durante o climatério/menopausa). Além do comportamento da atividade da enzima, esperamos poder contribuir para a determinação da função dela no organismo humano.
2. Caso você participe desta pesquisa, após ser examinada por seu médico ginecologista ou endocrinologista, ele verificará a necessidade de você fazer terapia de reposição hormonal (usar hormônio para repor o que o organismo feminino não produz quando entra na menopausa). Qual o tipo e a forma de hormônio que você vai usar (comprimido, creme, adesivo) é determinado pelo seu médico. Ele apenas informará ao pesquisador o tipo de hormônio que será utilizado e fornecerá também, dados relativos a seu peso e altura. Esses dados serão úteis para definir alguns resultados da pesquisa. Depois dessa consulta, seu médico encaminhará você para coletar sangue no **Bio Vitae Laboratório**, rua: Uruguai, 227 D, telefone/fax: 322-5016, na cidade de Chapecó, SC. Ele lhe dirá que você precisa ficar 12 horas sem comer nem beber nada (12h de jejum), antes de fazer a coleta do sangue. A única coisa permitida nessas 12 horas é beber água. Isso precisa ser feito, porque os valores para alguns exames podem dar alterados se não for feito jejum. Exemplo: na quinta-feira você se alimenta normalmente até às 20h (8 horas da noite). Depois disso, você não come nem bebe mais nada, a não ser água se sentir sede. Às 8 horas da sexta-feira, você vai até o laboratório para então coletar o sangue.
3. Seu sangue será coletado 2(duas) vezes. Uma logo após a sua consulta com seu médico e outra 90 a 120 dias depois de você começar a usar o hormônio. Como serão feitas as coletas: O sangue será coletado da veia que passa bem na dobra do seu cotovelo, direito ou esquerdo, após as 12 horas de jejum. A) Você será colocado sentado em uma cadeira que estará em sala apropriada para coleta. A pessoa que for coletar seu sangue será habilitada (capacitada) para esta função. Todo o material que ela utilizar, luvas, máscara, seringa, tubos, agulha, algodão e curativo são estéreis e descartáveis (materiais limpos e que após serem utilizados são destruídos). B) Após você estar devidamente acomodado na cadeira, seu braço será garroteado (amarrado por um pedaço de borracha) logo acima da dobra do cotovelo. Isso será feito para que a veia dilate (fique maior e mais visível) para facilitar a punção (picada da agulha) e será retirado tão logo a veia seja furada.. C) O local do braço onde será feita a punção será então bem limpo por algodão embebido (molhado) em álcool. D) Você então, receberá uma picada com uma agulha, o que vai causar uma pequena dor (semelhante a você

se espetar com um espinho – dor de uma agulhada). Essa agulha está adaptada a uma seringa e assim que a veia for furada, o sangue será aspirado (puxado) para dentro da seringa. Será tirado um volume de sangue mais ou menos igual a 2 (duas) colheres de sopa cheias (10mL). Depois de retirado o sangue, a agulha será retirada e você deverá ficar apertando o local da picada, com o algodão, por pelo menos 5 (cinco) minutos, quando então será colocado um curativo no local da picada.

4. Você deverá voltar ao laboratório, 90 a 120 dias depois de começar a usar o hormônio, para fazer a segunda coleta de sangue, da mesma maneira como foi realizada a primeira.
5. Quais são os riscos que você corre quando submetido à punção (picada) de uma veia: a) O local da picada poderá ficar arroxado: isso acontece quando não se pressiona (aperta) bem depois da retirada da agulha. Nesse caso o sangue continua saindo, só que por baixo da pele e o local ficará com uma mancha arroxada e levemente dolorida (exatamente como quando levamos uma pancada por exemplo) que deve permanecer por mais ou menos 5(cinco) dias. Essa mancha desaparece sozinha. Para diminuir o tempo da mancha e da dor, pode-se usar compressas (panos) quentes no local. \* Para evitar isso, é necessário que se faça à pressão do local da coleta por, pelo menos, cinco minutos que é o tempo necessário para que as plaquetas, que são responsáveis pela coagulação do sangue nesse caso, fechem o buraco da picada da agulha e impeçam o sangue de sair. b) Poderá haver uma infecção por bactérias (entrada de bactérias no sangue) se não for descontaminado (limpo) o local da picada. Isso acontece porque normalmente na nossa pele existem muitas bactérias, que são o que chamamos de “Flora normal da pele” e que não causam mal nenhum. Mas, se por algum motivo essas bactérias forem implantadas (colocadas) dentro das nossas veias, poderão causar infecções. O principal sintoma de uma infecção é a febre. Quando isso acontece, é necessário acompanhamento médico, exames de laboratório e eventual uso de antibióticos. \* Para evitar isso, todo o material utilizado é todo esterelizado e descartável e o local da picada é descontaminado (limpo) com álcool etílico a 70% (álcool diluído), que como preconiza o Ministério da Saúde é o indicado para esse caso. Qualquer dessas interferências deverá ser comunicada ao pesquisador, que tomará todas as providências necessárias para solucionar o problema, arcando com eventuais custos que possa haver.
6. Após a coleta, seu sangue será colocado em tubos de ensaio (frascos) para depois serem feitos os seguintes exames (dosagens): a) pesquisa de dislipidemias – alterações nas gorduras do sangue (CT, HDL, LDL, triglicérides); b) açúcar no sangue (GLC); c) exames que possam indicar problemas na glândula tireóide (T4 Livre, T3 Livre, TSH); d) exames que possam indicar problemas no fígado (TGO, TGP, fosfatase alcalina, GGT); e) exames que possam indicar anemia (hematócrito e hemoglobina); f) exames que possam indicar algum problema nos rins (uréia e creatinina); g) exames que vão determinar em que período do climatério (menopausa) a paciente está (Estradiol e FSH); h) exames que são o alvo desta pesquisa: determinação da atividade e tipo da BChE e que ainda não tem valores definidos para pacientes na menopausa. Esses exames de sangue serão feitos porque existem outras pesquisas que indicam que em diabetes, dislipidemias, problemas de tireóide, problemas renais, problemas de fígado e anemias a BChE se altera. Como nosso

interesse é só o valor desta enzima no climatério (menopausa), precisamos fazer esses exames para desconsiderar algumas dessas causas.

7. Eu, Maria Teresa Granella Lang, Farmacêutica Bioquímica e responsável por esta pesquisa, poderei ser contatada no telefone (49) 322-5016 ou 9997-0086 a qualquer hora, conforme consta no padrão ético e vigente no país.
8. Estão garantidas todas as informações que você queira, antes e depois do estudo.
9. Sua participação nesse estudo é voluntária. Você tem a liberdade de recusar participar do estudo, ou se aceitar participar, retirar seu consentimento a qualquer momento. Esse fato não implicará na interrupção do seu tratamento ou na atenção recebida do seu médico.
10. As informações relacionadas a esta pesquisa poderão ser inspecionadas pelos responsáveis pela pesquisa e pelas autoridades legais, no entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito de forma codificada, para que a confidencialidade seja mantida (não aparecerá seu nome em hipótese nenhuma).
11. Todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa não serão de responsabilidade do paciente.
12. Pela sua participação na pesquisa, não receberá qualquer valor em dinheiro. Como cortesia serão fornecidas a você, uma cópia dos resultados dos exames e uma carteira com seu tipo de sangue, gratuitamente, dois dias depois de coletado o sangue.  
 \*\* Esses resultados de exame, você deverá levar ao seu médico na próxima consulta para que ele avalie e se necessário lhe oriente caso seja necessário algum tipo de tratamento. Esse tratamento decorrente do resultado dos exames, não está relacionado à pesquisa.
13. Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome e sim um código.
14. Cópia dos resultados da pesquisa serão distribuídas aos médicos que encaminharem pacientes para pesquisa.

Eu, ..... li o texto acima e compreendi a natureza e objetivo do estudo (pesquisa) ao qual fui convidada a participar. A explicação que recebi, menciona os riscos e benefícios do estudo. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação na pesquisa a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem que essa decisão afete meu relacionamento com o meu médico. Eu entendi que não haverá qualquer custo para mim.  
 Eu concordo voluntariamente a participar deste estudo.

..... Data: .././... ..... data:  
 .././..

Assinatura paciente

Assinatura pesquisadora

## ANEXO 2

HOSPITAL DE CLÍNICAS – UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

Curitiba, 28 de junho de 2.002.

limo (a) Sr. (a)  
Maria Teresa Granella Lang  
Nesta

Prezado(a) Senhor(a):

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "**ATIVIDADE DA BUTIRILCOLINESTERASE, ANTES E APÓS TERAPIA DE REPOSIÇÃO HORMONAL, NO CLIMATÉRIO**", foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, em reunião realizada no dia 25 de junho de 2.002, o referido projeto atende aos aspectos das Resoluções CNS 196/96 , 251/97 e 292/99, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres: Humanos.  
**Protocolo CEP-HC N° 056ext010/2002-06.**

Atenciosamente.

Prof. Dr. Renato Tambara Filho  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Clínicas -UFPR



Dr. Renato



<b>Sociedade Brasileira de Análises Clínicas</b>			
<b>Protocolo de e-mail enviado</b>			
Protocolo Nº:	0112/04		
Enviado por:	Ronaldo	Aos cuidados de:	Vânia Manfredini de
Enviado Em:	10/02/2004	Possui anexados?	<input checked="" type="radio"/> Sim <input type="radio"/> Não
Nomes dos arquivos anexados:			

Ilma.Sra.  
Profa. Vânia Manfredini de Alcântara

Prezada Professora,

Gostaríamos de informar que o trabalho intitulado "**Efeitos de terapia de reposição hormonal sobre os níveis dos lípidos e da atividade da butirilcolinesterase no soro**", foi aceito para publicação na Revista Brasileira de Análises Clínicas, Vol 36/2004.

No entanto, ainda não está definido em qual edição será publicado, nº(s) 01, 02, 03 ou 04.

Sem mais para o momento, firmamo-nos.

Atenciosamente,  
Dr.Willy Carlos Jung  
Presidente